

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES



**“EFICIENCIA DE BIOACUMULACIÓN DE PLOMO POR
Spyrogira sp. A ESCALA DE LABORATORIO EN LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AMBIENTAL**

PRESENTADO POR:

VALERIA DEL PILAR ESPINOZA LAUS

2014



T

AMB

Espinoza Laus, Valeria del Pilar

“Eficiencia de Bioacumulación de Plomo por *Spyrogira sp.* a Escala de Laboratorio en la Universidad Nacional Agraria de la Selva”

72 páginas; 20 cuadros; 20 fgrs.; 28 ref.; 30 cm.

Tesis (Ing. Ambiental) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Recursos Naturales Renovables - 2014

1. SPYROGIRA

2. PLOMO

3. BIOMASA

4. MUESTRAS

5. BIOACUMULACION

6. ANALISIS



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María – Perú



FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

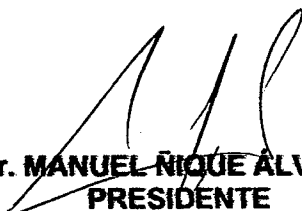
Los que suscriben, Miembros del Jurado de Tesis, reunidos con fecha 17 de diciembre de 2013 a horas 9:47 p.m., en la Sala de Conferencias del Departamento Académico de Ciencias Ambientales de la Facultad de Recursos Naturales Renovables, para calificar la Tesis titulada:

“EFICIENCIA DE BIOACUMULACIÓN DE PLOMO POR EL ALGA *Spyrogira sp.* A ESCALA DE LABORATORIO EN LA UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA”


Presentada por la Bachiller: **VALERIA DEL PILAR ESPINOZA LAUS**, después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara aprobado con el calificativo de **“BUENO”**

En consecuencia, la sustentante queda Apta para optar el Título de **INGENIERO AMBIENTAL**, que será aprobado por el Consejo de Facultad, tramitándolo al Consejo Universitario para la otorgación del Título correspondiente.

Tingo María, 13 de marzo de 2014.


Dr. **MANUEL NIQUE ALVAREZ**
PRESIDENTE




Lic. **EVA FALCON TARAZONA**
VOCAL


Dra. **TANIA GUERRERO VEJARANO**
VOCAL


Btgo. **CÉSAR GOZME SULCA**
ASESOR

DEDICATORIA

Al Creador de todo lo visible e invisible, principio y fin de todas las cosas, por regalarme el don de la vida, brindarme su amor y gracia infinita, por darme la fuerza necesaria para no flaquear en los momentos más difíciles y poder lograr uno de los objetivos más importantes de mi vida; y a mi dulce Madre Santísima, la Virgen María Reina del Cielo, la Llena de Gracia, pues de la mano me acerca cada día más hacia nuestro amadísimo Jesucristo.

A mis padres, Eliseo y Eva, pues son la mejor extensión del amor de Dios en la Tierra, gracias por su amor incondicional y paciencia pues son mi principal motor y motivo para ser una profesional exitosa.

A mis segundos padres, Pedro y Emilia, por haberme inculcado valores, amor hacia los demás y lo más importante transmitirme lo más hermoso, mi fe cristiana católica.

A mi tía Yesy que vive y vivirá por siempre en mi corazón y sé que está orgullosa por este logro mío.

A mis hermanos, Gustavo y Margareth, por su amor fraternal y tolerancia en los buenos y malos momentos.

A Aldo por regalarme parte de su tiempo, paciencia y comprensión, ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de tí, gracias por estar siempre a mi lado.

A toda mi familia por su cariño, confianza y apoyo moral.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar doy infinitamente gracias a Dios, por haberme dado fuerza y valor para concretar uno de mis grandes objetivos.

A los biólogos, Cesar Gozme Sulca y Julio Chía Wong, por otorgarme su apoyo, disponibilidad, motivación y asesoría para la realización de este trabajo de investigación.

A mis jurados por sus acertados consejos, para realizar de la mejor manera esta investigación.

A mis profesores que durante toda mi carrera profesional han aportado a mi formación, y en especial al microbiólogo Cesar López por sus consejos, enseñanzas y amistad.

Al Ing Richar Sías, técnico del laboratorio de Microbiología, por su amabilidad y amistad durante la evaluación de esta tesis.

A la Bachiller Gina Lorena Ramos Chepe, por brindarme su amistad y apoyo incondicional en la ejecución de este trabajo.

Al Sr. Zósimo Pujay, al Ing. Tonino Caballero, al bachiller Miguel Sánchez, personal del Laboratorio de Análisis de Suelos por su valioso apoyo en la preparación para el análisis de las muestras en el espectrofotómetro.

A mis amigos(as) Kelly, Keily, Luz, Priscila, Juridia, Franklin, Richard, Juan Daniel, Víctor por brindarme su amistad.

A todos muchas gracias...

INDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
a) Objetivo general	3
b) Objetivos específicos	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Metales pesados	4
2.2. Plomo.....	8
2.2.1. Origen.....	8
2.2.2. Comportamiento en el ambiente.....	10
2.2.2.1. Agua	10
2.2.2.2. Aire	10
2.2.2.3. Suelo	11
2.2.3. Efectos	11
2.2.4. Efectos tóxicos en humanos	14
2.3. Contaminación por plomo en el Perú.....	15
2.3.1. La Oroya.....	16
2.3.2. Rio Corrientes, Loreto.....	16
2.3.3. Raura – Lauricocha	17
2.4. Estrés por metales pesados	17
2.5. Remoción de metales pesados.....	18
2.5.1. Biomasa.....	20
2.6. Mecanismos de acumulación de metales pesados.....	24

2.7. <i>Spyrogira sp.</i>	25
2.8. Antecedentes de estudios de bioacumulación mediante <i>Spyrogira sp.</i>	28
2.8.1. Investigaciones internacionales	28
2.8.2. Investigaciones nacionales	30
III. MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1. Ubicación	32
3.1.1. Ubicación política.....	32
3.2. Materiales y equipos	32
3.2.1. Materiales	32
3.2.2. Material biológico.....	33
3.2.3. Equipos y reactivos usados	33
3.3. Metodología	34
3.3.1. Identificación microscópica de las algas del género <i>Spyrogira</i> antes y después del tratamiento.....	34
3.3.2. Determinación de las concentraciones de Pb en el medio acuoso experimental.....	35
3.3.3. Determinación de las concentraciones de Pb en la biomasa de <i>Spyrogira sp.</i> antes y después del tratamiento.....	37
3.3.4. Determinación de la concentración finales de Pb en el medio acuoso experimental.....	40
3.3.5. Determinación del grado de eficiencia en la bioacumulación de Pb por el alga <i>Spyrogira sp.</i>	40
3.4. Registrar los datos de temperatura y pH antes y después de los tratamientos	41

3.4.1. Parámetros de control en el experimento:	41
3.5. Unidades y variables experimentables	41
3.5.1. Unidad experimental	41
3.5.2. Variable dependiente	41
3.5.3. Variables independientes	42
3.6. Diseño estadístico	42
3.7. Análisis estadístico	43
3.7.1. Análisis de varianza	43
3.7.2. Modelo Aditivo Lineal	44
3.7.3. Prueba HSD Tukey	44
IV. RESULTADOS	45
4.1. Identificar microscópicamente las algas del género <i>Spyrogira</i> antes y después del tratamiento	45
4.2. Determinación de las concentraciones de Pb en la biomasa de <i>Spyrogira sp</i> antes y después del tratamiento	49
4.3. Determinación de las concentraciones finales de Pb en los medios acuosos después del tratamiento.	51
4.4. Determinación del grado de eficiencia en la bioacumulación de Pb por el alga <i>Spyrogira sp</i>	51
4.5. Análisis estadístico	53
4.6. Registrar los datos de temperatura y pH antes y después de los tratamientos	61

V. DISCUSIÓN	65
5.1. Identificar microscópicamente las algas del género <i>Spyrogira</i> antes y después del tratamiento.....	65
5.2. Determinación de las concentraciones de Pb en la biomasa de <i>Spyrogira sp.</i> antes y después del tratamiento.....	66
5.3. Determinación de las concentraciones finales de Pb en los medios acuosos después del tratamiento.	67
5.4. Determinación del grado de eficiencia en la bioacumulación de Pb por el alga <i>Spyrogira sp.</i>	67
5.5. Registrar los datos de temperatura y pH antes y después de los tratamientos	69
VI. CONCLUSIÓN	71
VII. RECOMENDACIONES	73
VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
IX. ANEXOS	79

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Metales pesados presentes en efluentes industriales.....	10
2. Determinación de los tratamientos.....	37
3. Descripción de los tratamientos en estudio.....	43
4. Análisis de Variancia (ANOVA).....	43
5. Concentraciones de Plomo determinadas en la biomasa de <i>Spyrogira sp.</i> antes de los tratamientos.....	49
6. Concentraciones de plomo determinadas en la biomasa de <i>Spyrogira sp.</i> expuesta a concentraciones metálicas de plomo (50, 100, 150, 200 y 250 mg/l).....	50
7. Concentraciones de plomo determinadas en los medios acuosos después del tratamiento a 24 horas de exposición en concentraciones de plomo de 50, 100, 150, 200 y 250 mg/l.	51
8. Porcentaje de eficiencia de bioacumulación promedio de plomo en <i>Spyrogira sp.</i> en diferentes tiempos de exposición y a diferentes concentraciones de plomo 50, 100, 150, 200 y 250 (mg/l).....	52
9. ANOVA. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo T1.....	53
10. HSD de Tukey. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo T1.....	54
11. ANOVA. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo T2.....	55
12. HSD de Tukey. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo T2.....	55
13. ANOVA. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo T3.....	56

14.	HSD de Tukey. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo T3.....	57
15.	ANOVA. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo T4.....	58
16.	HSD de Tukey. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo T4.....	58
17.	ANOVA. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo T5.....	59
18.	HSD de Tukey. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo T5.....	60
19.	Registro de variación de temperaturas.....	61
20.	Registro de variación del pH.....	63
21.	Descripción de los tratamientos en estudio.....	82

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Intersección de las elipses 1,2 y 3 muestra que el Cd, Cr, Cu y Pb son los metales más relevantes y con un elevado valor de toxicidad y peligrosidad (Díaz, 2001, citado por TENORIO, 2006).	7
2. Representación esquemática de los procesos de adsorción, absorción e intercambio iónico (Appelo y Postma, 1993, citado por TENORIO, 2003).	19
3. Transporte y acumulación de metales en la vacuola. FQ (fitoquelatina); el símbolo ~ indica consumo de ATP (CASTILLO y ROLDAN, 2005).	24
4. A. <i>Spyrogira sp.</i> ; una célula con núcleo central (n) y tres cloroplastos parietales (p) acintados provistos de numerosos pirinoides (py) (STELL y TORRIE, 1989).	27
5. Célula de <i>Spyrogira sp.</i> provista de un cloroplasto helicoidal, un núcleo, citoplasma y una vacuola limitada por la pared celular (MURRAY, 2002).	27
6. Diversos tipos de formación de oósfemas en las Zignemataceas. A, <i>Spyrogira</i> , con conjugación escaliforme; B, <i>Zygogonium</i> ; C, <i>Spyrogira</i> , con conjunción lateral (STELL y TORRIE, 1989).	28
7. Diseño estadístico.	42
8. <i>Spyrogira sp.</i>	45

9. Células de <i>Spyrogira sp.</i>	46
10. <i>Spyrogira sp.</i> (1,2 y 3) tres cloroplastos parietales acintados provistos de numerosos pirinoides.....	46
11. Observación microscópica de <i>Spyrogira sp.</i> después de la exposición.....	47
12. Observación microscópica de <i>Spyrogira sp.</i> después de la exposición.....	47
13. Células de <i>Spyrogira sp.</i> carentes de cloroplastos parietales definidos.....	48
14. Células de <i>Spyrogira sp.</i> carentes de cloroplastos parietales definidos.....	48
15. Gráfico de las medias.....	54
16. Gráfico de medias.....	56
17. Gráfico de las medias.....	57
18. Gráfico de las medias.....	59
19. Gráfico de las medias.....	60
20. Disminución de la temperatura a medida que aumenta la concentración del ion metálico en el medio.....	62
21. Variación del pH inversamente proporcional a las concentraciones de iones de Pb (II).....	64

RESUMEN

El presente estudio evaluó la eficiencia de bioacumulación de plomo (Pb) por el alga *Spyrogira sp.* a escala de laboratorio en la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS). Especímenes del alga fueron expuestos a diferentes concentraciones de 50, 100, 150 y 250 mg/l de plomo por un periodo de 24 horas. Las concentraciones finales del metal fueron determinadas por espectrofotometría de absorción atómica. Las mayores tasas de acumulación del metal fueron encontradas a una concentración inicial de 150 mg/l, la acumulación de plomo en el alga mostró un patrón lineal que incrementó con la exposición a la concentración y al tiempo. Los resultados encontrados permiten concluir que algas del género *Spyrogira sp.* poseen eficiente capacidad de acumulación de plomo, la que se encuentra en función de la concentración inicial de metal en el medio, registrando su mayor capacidad de acumulación y eficiencia a una concentración de 99.10 mg y tiempo de contacto de 12 horas, siendo 150 ppm (105 mg) la dosis inicial aplicada, logrando un 94.38 % de eficiencia de bioacumulación. Pudiéndose afirmar que el género *Spirogyra sp.* puede ser utilizado como acumulador en el tratamiento de aguas residuales.

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental por metales pesados es uno de los principales problemas a nivel mundial, la cual es generada por diversos procesos industriales, como la minería, metalurgia, curtiembre, producción de baterías, galvanoplastia, entre otras, las que producen residuos que contienen metales pesados que terminan transfiriéndose al medio ambiente debido a un incorrecto tratamiento o disposición final. Una vez liberados al ambiente, los metales pesados circulan entre los ciclos bióticos y abióticos; los metales no son biodegradables, trayendo como consecuencia su acumulación en la naturaleza y como en la cúspide de la pirámide se encuentra el hombre, este es quien recibe los metales de forma preconcentrada. Los metales pesados que encabezan la lista de toxicidad son plomo, mercurio y cadmio, para los cuales no se ha encontrado función biológica alguna (Volesky, 1994, citado por PLAZA, 2012).

En algunas partes del Perú el desarrollo industrial y el manejo inadecuado de los residuos que contienen metales pesados ha generado una problemática muy grave, un claro ejemplo es el caso de la ciudad de La Oroya la cual ha sido calificada en el año 2006 en un informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la quinta ciudad más contaminada del mundo, esto viene ocasionando el deterioro de los recursos hídricos del río Mantaro,

así como el suelo y lo más importante es la repercusión sobre la salud de sus pobladores.

Ante esto existe un variado número de métodos químicos para la eliminación de metales pesados de medios líquidos. Estos incluyen: precipitación, evaporación, intercambio iónico, tratamiento electroquímico y tecnologías de membrana. Estos procesos suelen ser costosos y poco eficientes, especialmente cuando se aplican en ambientes con concentraciones de metales por debajo de 100 mg.L^{-1} (Zhou y Kiff, 1991, citados por GARZA, 2005).

En tal sentido se busca la eliminación de estos metales pesados a través de métodos biológicos (bioadsorción, bioabsorción, bioacumulación, biomineralización) pues son más eficientes, rápidos y económicos que los métodos químicos y pueden ser aplicados a sistemas con bajas concentraciones de metales (Hutchins *et al.*, 1986, citados por GARZA, 2005).

Los métodos biológicos minimizan la generación de desechos tóxicos y permiten la recuperación del metal. La biorremediación es un proceso biotecnológico donde se utilizan sistemas biológicos para remover y recuperar sustancias contaminantes del ambiente. En el caso de las algas se utilizan cultivos con capacidad de bioacumular o bioadsorber contaminantes. La bioadsorción consiste en el atrapamiento pasivo de algunas sustancias, especialmente metales tóxicos en las estructuras externas de las células; este proceso es independiente del metabolismo celular (Wase y Foster, 1997, citados por GARZA, 2005).

De acuerdo a lo mencionado, se planteó la siguiente interrogante: ¿Cuál es la eficiencia de bioacumulación de plomo por el alga *Spyrogira sp.* a escala de laboratorio en la Universidad Nacional Agraria de la Selva? por lo que se sugiere la siguiente hipótesis: La eficiencia de bioacumulación de plomo es mayor a 75 % en el alga *Spyrogira sp.* a escala de laboratorio.

Por tanto se formularon los siguientes objetivos:

a) Objetivo general

- Evaluar la eficiencia de bioacumulación de plomo por el alga *Spyrogira sp.* a escala de laboratorio.

b) Objetivos específicos

- Identificar microscópicamente las algas del genero *Spyrogira* antes y después del tratamiento.
- Determinar las concentraciones de plomo en la biomasa de *Spyrogira sp.* antes y después del tratamiento.
- Determinar las concentraciones finales de plomo en los medios acuosos después del tratamiento.
- Determinar la eficiencia de bioacumulación de plomo por el alga *Spyrogira sp.*
- Registrar los datos de temperatura y pH antes y después de los tratamientos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Metales pesados

Distintas definiciones han sido establecidas para los metales pesados basándose en la densidad (gravedad específica), peso atómico (relativo a la masa atómica), número atómico y toxicidad. Los metales pesados son elementos con elevados pesos atómicos, superiores a 44 956 y una densidad superior a 5 g/cm^3 , excluyendo a los grupos Alcalino y Alcalinotérreo. Aunque algunos son imprescindibles para el desarrollo de las funciones vitales de los organismos, los denominados esenciales como cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc, vanadio y estroncio, en cantidades excesivas son perjudiciales e incluso letales para los seres vivos. Los metales pesados no esenciales comúnmente implicados en problemas de contaminación de las aguas subterráneas son: cromo, cadmio, mercurio, plomo, arsénico y antimonio (Kenninsh, 1992, citado por TENORIO, 2006).

En las aguas superficiales, los metales pesados están presentes como partículas y como fases disueltas, aunque debido a su baja solubilidad estas últimas suelen presentar concentraciones muy bajas en forma iónica o complejos organometálicos. En las formas coloidales y partículas aparecen como hidróxidos, óxidos, silicatos, sulfuros o adsorbidos en minerales del grupo de arcillas, sílice y materia orgánica. La solubilidad de los metales pesados en las aguas superficiales depende del pH, el tipo de ligantes en los que se

encuentran adsorbidos, el estado de oxidación de las fases minerales y el ambiente rédox del sistema (Connell y Miller, 1984, citados por TENORIO, 2006).

En las aguas subterráneas, el comportamiento de los metales pesados está en función de la composición del acuífero, la composición de la materia en suspensión y la composición química del agua, los acuíferos con mayores niveles de metales adsorbidos serán aquellos constituidos por arenas finas y limos. Asimismo, los metales pesados tienen una gran afinidad por los ácidos húmicos, arcillas orgánicas y óxidos cubiertos de materia orgánica. La química de agua controla la tasa de adsorción/ desorción de los metales hacia y desde el acuífero. La adsorción elimina el metal del agua y lo almacena en el acuífero, mientras que la desorción devuelve los metales al agua, favoreciendo su movilización. La desorción de los metales suele producirse debido a los siguientes cambios físico – químicos en el agua:

- Aumento de la salinidad, se produce competencia entre los metales y los cationes por ocupar espacios disponibles.
- Disminución del potencial rédox, normalmente bajo condiciones deficitarias de oxígeno.
- Disminución del pH, se produce un incremento de la competitividad entre los metales y los iones de hidrógeno por ocupar espacios disponibles. Además, provoca la disolución de los complejos metal-carbonato, liberándose los iones del metal en el agua.

Las acciones antrópicas a menudo conducen a cambios en las propiedades del entorno también introducen en el medio natural compuesto como iones, metales pesados, hidrocarburos, disolventes, órgano halogenados, sustancias orgánicas y componentes biológicos (bacterias, virus y gérmenes diversos) que degradan y alteran las características naturales, produciendo contaminación (Díaz, 2001, citado por TENORIO, 2006).

Así, la contaminación por metales pesados puede ser el resultado de la oxidación de sulfuros o de la disolución de ciertos carbonatos, o bien pueden ser aportados directamente por actividades industriales y/o mineras. En medios fuertemente reductores (materia orgánica abundante con suministro de sulfatos y pH elevado) pueden ser fijados como sulfuros (DOMENECH, 1995).

Para determinar la importancia de cada metal pesado considerado como tóxico al medio ambiente (Díaz, 2001, citado por TENORIO, 2006) propone un método gráfico basado en la procedencia y composición del metal. En la figura 1 se representan tres elipses que contienen metales tóxicos y peligrosos. Así en la elipse 1 figuran los metales procedentes de vertidos exógenos; en la elipse 2 aparecen los metales considerados como tóxicos y peligrosos y en el elipse 3 figuran los metales que se encuentran normalmente en el suelo. Según el análisis gráfico, la triple intersección de las elipses 1,2 y 3 muestra que el Cd, Cr, Cu y Pb son los metales más relevantes y con un elevado valor de toxicidad y peligrosidad. Además de estos metales, en la doble intersección de las elipses 2 y 3 se encuentra el Hg y por último en la intersección de las elipses 1 y 3 figuran el As, Ni, Mo y Zn.

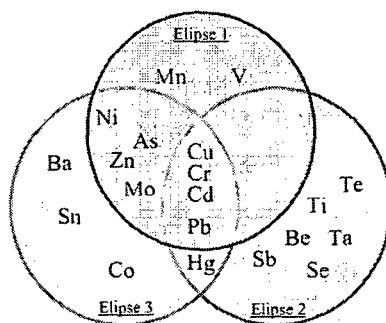


Figura 1. Intersección de las elipses 1,2 y 3 muestra que el Cd, Cr, Cu y Pb son los metales más relevantes y con un elevado valor de toxicidad y peligrosidad (Díaz, 2001, citado por TENORIO, 2006).

Generalmente la toxicidad de los metales pesados es proporcional a la facilidad de ser absorbidos por los seres vivos. Un metal disuelto de manera iónica puede absorberse más fácilmente que en estado elemental. Los efectos tóxicos dependen también del grado de oxidación en que se encuentre el metal, de su capacidad de enlace para formar compuestos organometálicos o de su interacción con otras sustancias como los ácidos nucleicos, proteínas y enzimas, que a su vez responden a funciones celulares, produciendo alteraciones en los tejidos y órganos de los seres (Díaz, 2001, citado por TENORIO, 2006). Otro de los factores que determina su peligrosidad es que, aun cuando se encuentren presentes en cantidades bajas e indetectables, la ya indicada inexistencia de vías naturales para la asimilación de estos compuestos (recalcitrancia) y consiguiente persistencia de los metales pesados en el agua, implica que a través de procesos naturales se produzca bioacumulación en los seres vivos, es decir, se da una concentración mayor que la del ambiente en el interior de los organismos debido a que su acumulación es más rápida que su

metabolización o excreción, generando un problema ecológico importante procesos conocido como biomagnificación (TENORIO, 2006).

2.2. Plomo

Es un metal pesado (densidad relativa o gravedad específica de 11.4 a 16 °C), no tiene olor ni sabor especial, de color grisáceo, con aspecto brillante cuando se corta; al ser expuesto al aire se oxida rápidamente lo cual se denota a través del tono mate que adquiere. Muy dúctil, maleable y resistente a la corrosión, pobre conductor de la electricidad, son características que lo hacen un elemento de amplia aplicación en metalurgia y electricidad. Numero atómico 82, masa atómica 207.19 g mol⁻¹, densidad 11.4 g ml⁻¹, se funde a 327 °C y hierve a 1725 °C. Es 11 veces más denso que el agua, se obtiene de la galena (sulfuro de plomo) que es la forma más abundante de este elemento en la naturaleza y se encuentra generalmente asociada a diversos minerales de zinc y en pequeñas cantidades, con cobre, cadmio y hierro, entre otros (MMARP, 2006).

2.2.1. Origen

La presencia de metales pesados en el suelo, al igual que en aguas subterráneas y superficiales, puede ser resultado de procesos naturales y de actividades antropogénicas, siendo esta última la principal responsable tanto de forma directa como indirecta del incremento de los niveles de metales pesados en el ambiente (Santos y de Oliveira, 2003; Dal Bosco *et al.*, 2005, citados por AGOUBORDE, 2008).

Procesos geoquímicos naturales que involucran a la erosión de rocas y, consecuentemente la disolución y reacción química entre sólidos,

líquidos y gases a través de los estados del ciclo hidrológico, permiten que metales que forman parte de la corteza terrestre, tales como zinc (Zn), selenio (Se), níquel (Ni), molibdeno (Mo), plomo (Pb), mercurio (Hg), cobre (Cu), cobalto (Co), cromo (Cr), cadmio (Cd) y arsénico (As) sean esparcidos en el suelo y en aguas superficiales después de periodos de lluvia (He *et al.*, 2005, citados por AGOUBORDE, 2008).

Por su parte, la actividad antropogénica es responsable del incremento de estos elementos en aguas superficiales (por medio de la descarga de residuos líquidos), en el aire (por medio de procesos de combustión) y en el suelo (a través de actividades agropecuarias) (Jarup, 2003, citado por AGOUBORDE, 2008).

Los efluentes industriales son considerados como uno de los principales responsables tanto directos como indirectos de la contaminación de aguas superficiales. Efluentes como los producidos por refinerías de petróleo, industrias de pulpa y papel, textiles, metalúrgicas, industrias productoras de químicos orgánicos e inorgánicos, de plástico, por curtiembres, mineras, de galvanoplastia, entre otras, contienen una gran cantidad de metales pesados. (AHLUWALIA y GOYAL, 2007).

En el Cuadro 1 se puede observar los distintos metales pesados que suelen estar presentes en los efluentes generados por estas industrias (Manzoor *et al.*, 2006, citado por AGOUBORDE, 2008).

En general, el tipo y concentración de los metales pesados presentes en los residuos líquidos generados por las distintas industrias va a

depender del proceso productivo, de la etapa en que se produzcan y de la materia prima utilizada (Sharma *et al.*, 2007, citado por AGOUBORDE, 2008).

Cuadro 1. Metales pesados presentes en efluentes industriales.

	Fe	Mn	Zn	Cu	Ni	Hg	Pb	Cd	Cr	As	Al	Sn	Sb
Refinerías de petróleo	x		x	x	x		x		x	x			
Textiles	x	x	x	x	x		x	x	x				
Metalúrgicas	x		x		x		x	x	x	x			x
Químicos orgánicos	x		x			x	x	x	x	x	x	x	
Químicos inorgánicos	x		x			x	x	x	x	x	x		
Plásticos	x												
Curtiembres									x				
Mineras		x		x		x	x	x		x			
Drenaje ácido de minas	x	x	x	x								x	
Galvanoplastia		x	x	x	x	x	x		x				

Fuente: Manzoor *et al.* (2006), citado por AGOUBORDE (2008).

2.2.2. Comportamiento en el ambiente

2.2.2.1. Agua

El Pb inorgánico que proviene de varias fuentes industriales y mineras existe en el agua en el estado de oxidación +2 (MANAHAN, 2007). El Pb puede acumularse en los sedimentos de ríos y lagos, o bien ser arrastrado hacia el mar en donde también puede precipitarse y depositarse en los sedimentos marinos que se constituyen en un sumidero en el cual este elemento está relativamente inaccesible, ya que los suelos retienen por lo general el metal depositado en ellos, se reduce el potencial de contaminación de los acuíferos (INE, 2001).

2.2.2.2. Aire

En el pasado se utilizaban una gran cantidad de compuestos de Pb que después se emitían a la atmósfera a partir de los procesos de combustión, principalmente provenían de los automóviles en sitios donde se utilizaban

combustibles con Pb. Una vez en el aire, eran transportados dependiendo de las condiciones ambientales (velocidad y dirección del viento, precipitación y humedad). Posteriormente, sedimentados por la precipitación y depositados en la vegetación y en suelo (FERNÁNDEZ *et al.*, 2004).

2.2.2.3. Suelo

El suelo es el principal receptor de los metales pesados, por lo que todos los compuestos del Pb se acumulan en éste (FERNÁNDEZ *et al.*, 2004). El Pb presente en el suelo no se comporta como un elemento estático, sino que sigue un curso dinámico. Este movimiento en el suelo puede llevarse a cabo por cuatro procesos (NAVARRO *et al.*, 2007):

- Movilización a las aguas superficiales o subterráneas.
- Transferencia a la atmósfera por volatilización.
- Absorción por las plantas e incorporación a las cadenas tróficas.
- Retención en el suelo de distintas formas: pueden ser fijados por procesos de adsorción, complejación y precipitación.

2.2.3. Efectos

Los metales pesados ejercen efectos biológicos que pueden ser beneficiosos o perjudiciales para los distintos organismos. No son biodegradables y tienden a acumularse en los organismos, causando numerosas enfermedades y trastornos (Inglezakis *et al.*, 2003, citados por AGOUBORDE, 2008). Elevadas concentraciones de algunos de estos elementos en el ambiente o en determinados procesos pueden desencadenar una serie de problemáticas que van desde la degradación y pérdida de

fertilidad de suelos (Kizilkaya *et al.*, 2004 y Arias *et al.*, 2005, citados por AGOUBORDE, 2008).

Elementos tales como el Hg, Pb, Cd, y As no son considerados como esenciales para ningún organismo, la respuesta de un ser humano tras un contacto con un metal pesado puede producir efectos agudos y crónicos dependiendo de la duración de dicho contacto (Caussy *et al.*, 2003 y He *et al.*, 2005, citados por AGOUBORDE, 2008).

La toxicología del plomo ha sido ampliamente estudiada. El plomo inorgánico es en general, un veneno metabólico y un inhibidor de enzimas, mientras que el plomo orgánico, como tetraetilplomo (TEP) o tetrametilplomo (TMP), es más venenoso que el inorgánico. Como síntomas precoces en la toxicología del plomo se han descrito dolores de cabeza, óseos y abdominales, trastornos del sueño, impotencia, trastornos de conducta, etc., mientras que como síntomas avanzados aparecen anemia, cólicos, náuseas, trastornos renales, delirios, daños al feto, hipertensión arterial, alteración nerviosa y cáncer (Volesky, 1990, citado por TENORIO, 2006).

La causa primaria del elevado nivel de toxicidad a nivel químico es que los metales pesados poseen una gran capacidad para unirse con moléculas orgánicas. En efecto, estos efectos tóxicos en sistemas biológicos dependen de reacciones con ligandos que son esenciales para su asimilación, y estos ligandos están, a su vez, presentes en gran abundancia en la célula, ya sea formando parte de moléculas de mayores dimensiones, ya sea como moléculas aisladas. En este sentido, cabe destacar la gran afinidad que muestran los metales pesados, como principales ligandos, por grupos sulfidrilo,

radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. El resultado de estas uniones ligando-metal puede ser muy perjudicial para la célula destacando: (1) la acción genérica sobre proteínas por inhibición de la actividad o por disrupción en la estructura de las mismas, (2) el desplazamiento de elementos esenciales de su metabolismo estándar, produciendo efectos de deficiencia, y (3) la catálisis de reacciones de generación de moléculas ROS (Reactive Oxygen Species) o radicales libres que provocan fenómenos de estrés oxidativo (NAVARRO *et al.*, 2007).

Según NAVARRO *et al.* (2007), el estrés oxidativo es un fenómeno que merece ser estudiado aisladamente, dada su complejidad e importancia en el desarrollo de los mecanismos básicos de la célula. Como resumen de dicho fenómeno basta decir que provoca daño a distintos niveles, destacando los siguientes aspectos:

- Inactivación de proteínas y enzimas, fundamentalmente por la oxidación de los grupos sulfhídrico, dando lugar a puentes disulfuro que causan la interrupción del funcionamiento normal de la proteína o enzima, modificación de la conformación de enzimas y poli nucleótidos.
- Peroxidación lipídica de membranas, causando rupturas y subproductos de las cadenas hidrocarbonadas.
- Efectos de daño sobre el ADN. Estos pueden ser desperfectos genotóxicos: mutaciones, aberraciones cromosómicas, alteraciones en la síntesis y reparación de ácidos nucleicos y transformaciones celulares.

- Bloqueo de sus grupos funcionales.
- Ruptura e inhibición de biomoléculas.

2.2.4. Efectos tóxicos en humanos

El plomo se distribuye en el cuerpo humano de acuerdo a un modelo toxico cinético de tres compartimentos. La sangre y los tejidos suaves representan los compartimentos activos, mientras que los huesos representan el compartimiento de almacenamiento. El plomo se distribuye hacia el epitelio tubular de los riñones y hacia el hígado. Existe además una redistribución mediante la deposición del plomo en huesos, dientes y cabeza. El plomo que permanece en la sangre se adhiere a la hemoglobina en los eritrocitos, en los cuales se llega a alcanzar una concentración de plomo 16 veces superior a la que se puede presentar en el plasma (IPCS, 1994).

La vida media biológica del plomo es muy difícil de estimar; sin embargo, se ha observado que la vida media en eritrocitos es de 35 días, de 40 días en tejidos suaves (riñones, hígado y tejido nervioso) y en huesos de 20 a 30 años. En general, la excreción del plomo es baja. Entre las vías que utiliza el organismo para desecharlo se tiene que la excreción urinaria es cercana al 76% de la excreción diaria, mientras que la eliminación por secreciones gastrointestinales es del 16% y el 8% restante se acumula en el cabello, uñas, sudor, etc. (IPCS, 1994).

La información sobre las dosis a las cuales los compuestos orgánicos de plomo causan efectos en el ser humano es limitada, en pacientes con envenenamiento por inhalación de vapores de gasolina se presentan niveles superiores a los 100 µg/dL de plomo en sangre. En otros casos se

encontraron niveles de 350 µg/dL en orina de pacientes con envenenamiento por TEL. La dosis letal inferior reportada (LDL0) para el hombre es de 1470 µg/kg (IPCS, 1994).

El envenenamiento por los compuestos orgánicos del plomo puede presentar diversos efectos agudos en el sistema nervioso central. Estudios realizados demostraron intoxicación por inhalación deliberada de vapores de gasolina con plomo. La inhalación y la absorción dérmica son las principales rutas de exposición al TEL y TML (IPCS, 1994).

2.3. Contaminación por plomo en el Perú

El impacto de la contaminación por metales pesados en la salud de las personas en nuestro país se ha evidenciado en niveles de plomo en sangre que sobrepasan en dos o más veces el límite máximo de 10 microgramos de plomo por cada decilitro de sangre, permitido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para los niños, siendo las poblaciones de La Oroya (Junín), Cerro de Pasco, Lauricocha (Huánuco) y río Corrientes (Loreto) las más afectadas y conocidas por su capacidad de respuesta frente al problema. Sin embargo, recién a partir del segundo quinquenio de la primera década del presente siglo se han realizado nuevas denuncias de poblaciones afectadas en su salud por la contaminación por metales pesados en Puno, Madre de Dios, Ancash, Cajamarca, evidenciando la presencia de plomo, cadmio, arsénico, mercurio y otros metales pesados en las poblaciones a las que se le hizo dosaje en sangre y orina (CONKLIN *et al.*, 2008).

2.3.1. La Oroya

La operación del complejo metalúrgico de La Oroya, comprende el procesamiento de concentrados de plomo, zinc y cobre, considerados “sucios” por su alto contenido de impurezas, los que, al ser procesados para obtener metales refinados, emiten partículas y efluentes con contenidos de plomo, arsénico y cadmio al aire y al río Mantaro (RAMOS *et al.*, 2009).

Según la información de los censos hemáticos realizados en La Oroya desde el 2004 al 2008 por el CENSOPAS del MINSA, salvo el del 2007 efectuado por la empresa Blufstein, si bien el nivel promedio de plomo en sangre en niños menores de 6 años se ha reducido un 9.3 % desde 32.1 ug/dl el 2004 a 29.1 ug/dl el 2006 y ha continuado descendiendo hasta el 2008, el promedio de este último año todavía está en el rango de 20 a 44.9 ug/dl, debido a que el 52.8 % de los niños el 2008 tienen más de 20 ug/dl, es decir, más del doble permitido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (RAMOS *et al.*, 2009).

2.3.2. Río Corrientes, Loreto

El Ministerio de Salud publicó el 29 de mayo del 2006 el informe de la visita de reconocimiento para la evaluación de la calidad sanitaria de los recursos hídricos y muestreo biológico en las comunidades de la cuenca del Río Corrientes. Señala que en el muestreo biológico a 199 personas, 125 mujeres y 74 hombres, el 66.21% de los hombres menores a 18 años superó el límite máximo permisible para plomo en población infantil (10 microgramos de plomo por cada decilitro de sangre, según la OMS), el 44.59% presentaba niveles entre 10 y 15 microgramos de plomo en sangre correspondiendo a

jóvenes entre 13 y 17 años y el 79.20% de los adultos presentaba niveles de plomo entre 10 y 20 microgramos por decilitro de sangre siendo en su mayoría de edades entre los 18 y 39 años (RAMOS *et al.*, 2009).

2.3.3. Raura – Lauricocha

La compañía minera Raura viene operando más de 40 años en la zona de Lauricocha (Huánuco), donde el 2007 en el centro poblado menor de Raura Nueva se ha verificado que el 93.7 % de los niños tienen niveles de plomo en sangre superiores al máximo permitido por la OMS. Es importante señalar, que en el 2008, los resultados del monitoreo de los recursos hídricos en la cuenca del río Lauricocha por parte de DIGESA, muestra que en las lagunas Santa Ana, Cabalcocha, y Lauricocha el contenido de plomo se excedió la norma en 2 y 3 veces al año (RAMOS *et al.*, 2009).

2.4. Estrés por metales pesados

La toxicidad de un ion metálico depende de la capacidad de interactuar con las moléculas de la célula, por lo tanto, el agente de toxicidad es el ion y no el metal, el cual no es soluble. Su peligro real depende de la concentración de iones solubles presentes en el sustrato y disponibles para la planta. La razón por la que los metales son tóxicos es porque causan estrés oxidativo, el cual se define como aquel tipo especial de estado bioquímico de una célula o tejido, que puede ocurrir en plazos cortos o largos, en donde la generación de especies químicas oxidantes rebasa la capacidad de producción o la actividad de especies antioxidantes (Pilon, 2002, citado por PEÑA *et al.*, 2005).

Redd y Gadd (1989), citados por PEÑA *et al.* (2005) indican que en las algas, los efectos tóxicos de los metales pueden incluir: (1) incremento irreversible de la permeabilidad del plasmalema, que conduce a la pérdida de solutos en la célula y cambios en el volumen celular; (2) reducción en el transporte electrónico y en la fijación del carbono fotosintético; (3) inhibición del consumo respiratorio del oxígeno; (4) interrupción de los procesos de captación de nutrientes; (5) inhibición enzimática; (6) desarrollo morfológico anormal y cambios ultra estructurales (alteraciones celulares); (7) debilitamiento de la movilidad y pérdida de flagelos en algunas microalgas y (8) degradación de pigmentos fotosintéticos, junto con reducción del crecimiento y en casos extremos, mortalidad celular.

2.5. Remoción de metales pesados

En la actualidad existen una serie de procesos que son utilizados en la remoción de metales pesados, entre los que se encuentran la precipitación química, la filtración por medio de membranas, la reducción electrolítica, la extracción por medio de solventes, el intercambio iónico y la adsorción. Algunas de estas tecnologías no son aplicables en todas las situaciones, debido a una serie de inconvenientes tales como: baja eficiencia y aplicabilidad a una amplia gama de contaminantes, generación de residuos, dificultad de encontrar condiciones óptimas de operación cuando se presentan distintos metales pesados en una solución y la necesidad de pre tratamientos. (AGOUBORDE, 2008).

El proceso en el cual las moléculas se concentran en una capa interfacial se conoce como adsorción. Si las moléculas penetran al interior de la

fase sólida, el proceso es conocido como absorción. El término sorción generalmente es utilizado cuando los procesos de adsorción y absorción ocurren simultáneamente y no se pueden distinguir uno de otro, mientras que si la adsorción de una o varias especies iónicas es acompañada por la desorción simultánea de una cantidad equivalente de especies iónicas, el proceso se denomina como intercambio iónico (Dabrowski, 2001, citado por AGOUBORDE, 2008). La representación esquemática de la adsorción, absorción e intercambio iónico se puede observar en la Figura 2.

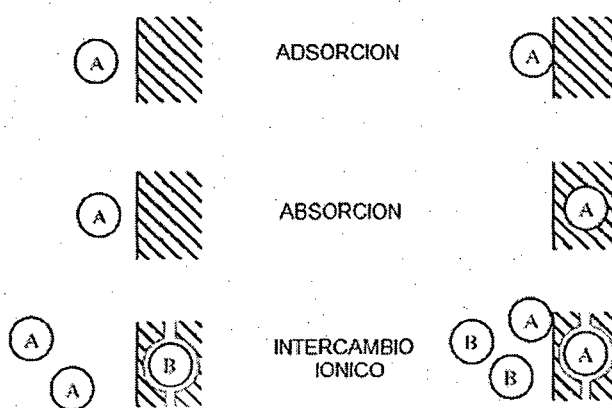


Figura 2. Representación esquemática de los procesos de adsorción, absorción e intercambio iónico (Appelo y Postma, 1993, citado por TENORIO, 2003).

La biomasa de algas se ha utilizado para procesos de biorremediación de aguas residuales contaminadas con metales pesados, debido a su capacidad para eliminar tales contaminantes, ya sea por adsorción sobre la superficie de la célula o por incorporación a las propias células. Dos rutas bioquímicas diferentes se pueden seguir: biosorción (o la adsorción de iones de metal sobre la superficie de la célula) y la bioacumulación (o

absorción de metal en la célula) (Rangsayatorn *et al.*, 2002, citado por MANE, 2012).

2.5.1. Biomasa

La utilización de biomasa de algas, hongos y bacterias como material bioacumulador está siendo cada vez más considerada como una alternativa viable para la remoción de compuestos tóxicos desde aguas residuales (Selatnia *et al.*, 2004, citados por AGOUBORDE, 2008).

El proceso de acumulación de metales pesados en la biomasa puede ser dividido principalmente en dos categorías: biosorción por medio de biomasa inactiva y bioacumulación por células vivas (Zouboulis *et al.*, 2003, citados por AGOUBORDE, 2008).

La acumulación de metales pesados se lleva a cabo en dos fases: la fase activa de acumulación, corresponde a la etapa inicial y es la fase rápida del proceso, se da cuando los metales son absorbidos a la superficie del alga por atracción electrostática a los sitios cargados negativamente; la fase pasiva, que es mucho más lenta, durante ésta los iones metálicos son transportados a través de la membrana celular y dentro de los organelos intracelulares (Chong *et al.*, 2000 y Sánchez *et al.*, 2001, citados por PEÑA *et al.*, 2005). Reed y Gadd (2000), citados por OSPINA *et al.* (2006), definen que la acumulación de metales en algas es un proceso generalmente representado por una fase activa y otra pasiva, la fase de acumulación activa, está menos limitada por factores externos que afectan el metabolismo tales como temperatura, luz, pH y salinidad, por cuanto se realiza de manera más rápida. Según Lobban y Harrison, 1994, citados por PEÑA *et al.* (2005), la incorporación de plomo se

realiza de forma pasiva con participación de polisacáridos cargados en la pared celular y en la matriz intracelular. Recientemente Baker y Walter (2000), citados por OSPINA *et al.* (2006) sugirieron que los diferentes patrones de acumulación de metales en plantas pueden estar relacionados con los mecanismos de tolerancia. Para esto describieron tres estrategias básicas que se asocian a tres modelos lineales: 1) la estrategia de exclusión, se da cuando la concentración de metal en la planta está por encima del rango de concentraciones del metal en el medio, sugiriendo que la concentración en la planta se mantiene a un nivel bajo constante hasta que se alcanza una concentración crítica en el ambiente, presentándose toxicidad y transporte no restringido del metal en la planta; 2) la estrategia de acumulador, se da cuando los metales se concentran activamente en los tejidos, por encima del rango de concentración del ambiente, implicando una fisiología altamente especializada; y 3) la estrategia de indicador, que ocurre cuando la captación de metales y el transporte al interior de la planta son regulados, u ocurre la acumulación pasiva, de modo que las concentraciones internas reflejan exactamente las concentraciones externas.

La acumulación de iones metálicos depende de la concentración de iones metálicos en la solución, hasta que la concentración da lugar a efectos tóxicos generándose una disminución del rendimiento de la bioacumulación (Yan y Pan, 2002, citados por MANE y BHOSLE, 2012). Este comportamiento ha sido ampliamente documentado en especies de macro y micro algas donde la acumulación de metales en el organismo es función de la disponibilidad de los contaminantes y del tiempo de exposición a ellos (Baker, 2000; Levine,

1984; Seeliger, 1977 y Wilcox *et al.*, 1998, citados por OSPINA *et al.*, 2006). Estudios de laboratorio y de condiciones *in situ* han demostrado que la concentración de metales en algas marinas refleja la concentración de estos en el ambiente (Morris, 1975; Powell, 1997 y Vera, 2002, citados por OSPINA *et al.*, 2006). A mayor concentración los cationes metálicos pueden competir en la absorción de iones metálicos en sitios activos a nivel de membrana (Cheeseman, 1988; Reed y Gadd, 2000 y Wilcox *et al.*, 1998, citados por OSPINA *et al.*, 2006).

El estudio de acumulación de cadmio (Cd), cromo (Cr), selenio (Se) y zinc (Zn) en las macroalgas *Ulva lactuca* y *Gracilaria blodgettii* encontró que la tasa de acumulación en el alga decrece con el incremento de la concentración del metal e indican que estas algas tienen una mayor respuesta de acumulación a menores concentraciones de metal (Wang y Lewis, 1997, citados por OSPINA *et al.*, 2006). Los resultados pioneros de Bryan (1969) citado por OSPINA *et al.* (2006) demostraron que la tasa de absorción de zinc en *Laminaria digitata* disminuía a altas concentraciones del metal, resultando valores muy bajos del factor de bioconcentración a concentraciones altas de zinc.

CASTILLO y ROLDAN (2005) indican que la eficiencia aumenta con la concentración del metal hasta alcanzar una saturación, es máxima entre 5 y 40 °C y puede soportar un amplio intervalo de acidez del medio. La influencia del pH se debe al efecto sobre la solubilidad del metal, la estructura del absorbente y el estado del grupo que liga el metal.

Los bioensayos con algas se han convertido en una herramienta práctica para el manejo y control de la contaminación por metales pesados, principalmente por su capacidad de absorber metales desde el agua. Sin embargo, es importante considerar que existen factores físicos y biológicos que afectan la acumulación de metales; entre los que se encuentran la temperatura, luz, estacionalidad, pH, salinidad, entre otros (Lobban y Harrison, 1994 y Wang y Lewis, 1997, citados por OSPINA *et al.*, 2006).

El proceso de absorción de los metales sobre la biomasa es controlada por atracción iónica. A valores bajos de pH, la superficie de la célula se carga positivamente, reduciendo la atracción entre los iones metálicos y los grupos funcionales de la pared celular, en contraste, cuando el pH aumenta la superficie de la célula se carga negativa y el proceso de retención se ve favorecido (Gabriel, 1982 y Volesky, 1987, citados por MODHER *et al.*, 2009). El aumento de la capacidad de biosorción es atribuido al aumento del pH, a pH bajos la solución se protona debido a los valores específicos de pKa (logaritmo negativo de la constante de disociación ácida de un ácido débil) de los sorbatos generando repulsión entre los sitios de unión (grupos funcionales) de la pared celular y los iones metálicos de la solución causando disminución de la absorción (Romera *et al.*, 2006, citados por YAQUB *et al.*, 2012).

Seki *et al.* (1998), citados por MODHER *et al.* (2009) afirman que la reacción de absorción podría ser debido al aumento de la temperatura pues aumenta la velocidad de difusión de las moléculas del sorbato a través de las capas externas de la pared celular.

2.6. Mecanismos de acumulación de metales pesados

Los seres vivos desarrollan mecanismo de defensa contra algunas sustancias tóxicas. Este es el caso de las fitoquelatinas (FQ) y las metalotioneínas (MT), que son péptidos de elevado contenido en grupos tiol generados por plantas y animales, en respuesta a una incorporación o una ingestión excesiva de metales pesados, estas biomoléculas enlazan fuertemente los iones metálicos con el fin de disminuir su toxicidad. Las algas son capaces de generar una cantidad suficiente de fitoquelatinas (MONTORO, 2009).

La capacidad para acumular metales se debe a las fitoquelatinas, polímeros de glutatión cuya síntesis se activa por exposición a iones metálicos, las fitoquelatinas intervienen en el confinamiento vacuolar de los metales pesados, los complejos FQ – metal se acumulan en las vacuolas (CASTILLO y ROLDAN, 2005).

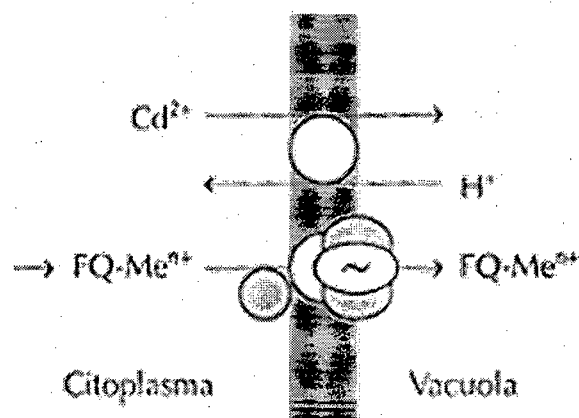


Figura 3. Transporte y acumulación de metales en la vacuola. FQ (fitoquelatina); el símbolo \sim indica consumo de ATP (CASTILLO y ROLDAN, 2005).

2.7. *Spyrogira* sp.

a. Clasificación

Clasificación taxonómica de *Spyrogira* sp., según PEÑA *et al.* (2005):

Reino: Plantae

Subreino: Viridiaeplantae

Infrareino: Streptophyta

División: Charophyta

Subdivisión: Conjugophytina

Clase: Conjugophyceae

Orden: Zygnematales

Familia: Zygnemataceae

Género: *Spyrogira*

b. Hábitat

Habita en aguas dulces, como ríos y arroyos. También en aguas estancadas, como charcos y lagunas, existen más de 400 especies de *Spyrogira* en el mundo y tienen aproximadamente entre 10 y 100 μm de ancho y puede llegar a varios centímetros de longitud.

c. Características generales

La *Spyrogira* es un alga verde de agua dulce, normalmente filamentosa formada por células todas semejantes, aisladas con pared simple,

la pared celular, generalmente delgada, está formada de dos capas de las que la externa péptica, está transformada en mucílago, lo que da a estas algas un tacto mucoso característico (STELL y TORRIE, 1989).

A su vez la pared celular posee muchos grupos funcionales electronegativos, tales como hidroxilo (OH), fosforilo (PO_3O_2), amina (NH_2), carboxilo (COOH), sulfhidrilo (SH), etc., que confieren la adsorción de cationes de metales pesados (Davis *et al.*, 2003, citados por YAQUB *et al.*, 2012), éstos grupos funcionales son constituyentes de la pared celular, tales como, heteropolisacáridos y proteínas, los cuales funcionan como sitios de unión de metal (Naja y Volesky, 2006, citados por YAQUB *et al.*, 2012). Por su parte GUPTA *et al.* (2012), realizaron análisis de espectrofotometría FTIR a las células de algas de género *Syrogira sp.* los que mostraron la presencia de grupos funcionales ionizables (es decir, carboxilo, amino, amida e hidroxilo) capaces de interactuar con los protones o iones metálicos.

En cada célula, el núcleo con frecuencia voluminoso y provisto de un gran nucléolo, está siempre situado en el centro de la célula, unido al citoplasma parietal por tractos citoplasmáticos radiales; el núcleo es siempre axial, pero los plastos son parietales tienen la forma de largas cintas espiraladas, con bordes denticulados y gruesos hacia el interior en su parte media, provistos de numerosos pirenoides. STELL y TORRIE (1989) indican que según la especie, cada célula contiene de uno a cinco plastos espiralados y las vacuolas son con frecuencia ricas en tanoides (Figura 4 y 5)



Figura 4. A. *Spyrogira sp.*; una célula con núcleo central (n) y tres cloroplastos parietales (p) acintados provistos de numerosos pirinoides (py) (STELL y TORRIE, 1989).

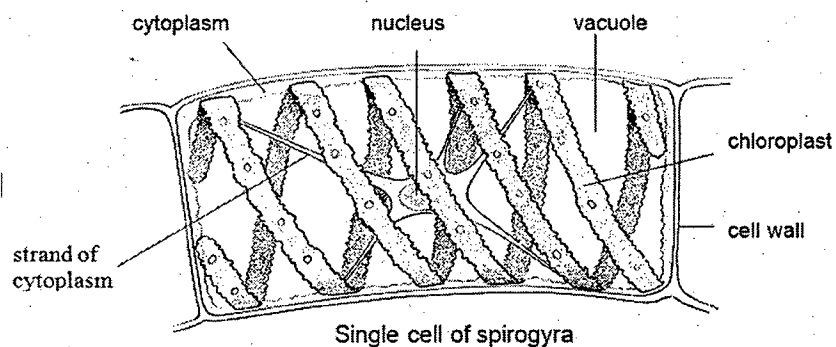


Figura 5. Célula de *Spyrogira sp.* provista de un cloroplasto helicoidal, un núcleo, citoplasma y una vacuola limitada por la pared celular (MURRAY, 2002).

La *Spyrogira sp.*, es una especie dioica, el contenido de las células del filamento masculino se vierte en las células del filamento femenino y los dos filamentos se mantienen unidos entre si por un tubo; este tipo de conjugación se llama escaliforme Figura 4. Algunas *Spyrogira* son monoicas, es decir son dos células vecinas de un mismo filamento las que fusionan entre si mediante un tubo de conjugación que nace lateralmente entre las dos células; esta conjugación se conoce como lateral (STELL y TORRIE, 1989)

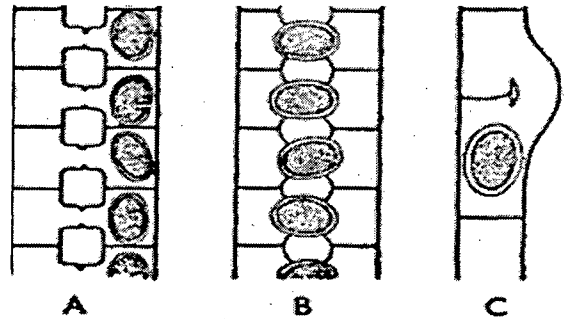


Figura 6. Diversos tipos de formación de oósfemas en las Zygnemataceas. A, *Spyrogira sp.*, con conjugación escaliforme; B, Zygonium; C, *Spyrogira sp.*, con conjunción lateral (STELL y TORRIE, 1989).

Las microalgas se protegen a sí mismas contra la toxicidad causada por metales pesados usando varios mecanismos tales como: mecanismos de exclusión, adsorción a la superficie celular o acumulación intracelular. Por tanto se puede predecir a las algas verdes filamentosas como potenciales biosorbentes o bioacumuladores eficientes debido a la bioquímica de su pared celular, lo cual ha abierto las puertas de opción rentable para emplearlos en la tecnología de tratamiento de aguas residuales (MANE y BHOSLE, 2012).

2.8. Antecedentes de estudios de bioacumulación mediante *Spyrogira sp.*

2.8.1. Investigaciones internacionales

OSPINA *et al.* (2006) realizó bioensayos con algas para el manejo y control de la contaminación por sustancias tóxicas, en parte por sus propiedades ecológicas y fisiológicas para responder a un amplio espectro de situaciones ambientales. El investigador evaluó la capacidad de acumulación de plomo (Pb) en el alga verde *Rhizoclonium riparium* en condiciones de laboratorio. Especímenes del alga fueron expuestos a concentraciones de 0,1,

1,0, 10 y 15 $\mu\text{g/ml}$ de plomo por periodos de 2, 12, 24 y 144 horas a diferentes concentraciones de salinidades (0, 5, 15, 30 y 60 %). Las concentraciones de metal fueron determinadas por espectrofotometría de absorción atómica. Las mayores tasas de acumulación del metal fueron encontradas a una salinidad de 15 %. Las concentraciones de metal en el alga mostraron un patrón lineal que incrementó con la exposición en el tiempo. Los resultados encontrados permiten concluir que la capacidad de acumulación de plomo en esta especie está influenciada por la salinidad del agua de mar y es función de la concentración de metal en el medio y del tiempo de exposición, registrando su mayor capacidad de acumulación entre 1 y 1,0 $\mu\text{g/ml}$.

GUPTA y RASTOGI (2008) realizaron una investigación en el departamento de química del Instituto de Tecnología Roorkee de la India, cuyos resultados muestran la sorción de Pb (II) a partir de biomasa de algas verdes filamentosas *Spyrogira sp.*, para lo que se llevó a cabo experimentos para determinar las propiedades de biosorción de la biomasa y se observó que la capacidad máxima de adsorción de iones de Pb (II) fue alrededor de 140 mg de metal por g de biomasa a pH 5,0 en 100 minutos. El análisis espectrofotométría atómica de la biomasa del alga reveló la presencia de grupos carboxilo, hidróxilo y carbonilo aminoácidos, que son responsables de biosorción de iones metálicos. Finalmente, los resultados indicaron que la biomasa de *Spyrogira sp.* es un bioadsorbente eficiente para la eliminación de Pb (II) a partir de soluciones acuosas.

MODHER *et al.* (2009) llevaron a cabo una investigación en el Laboratorio de Ficología de la Facultad de Ciencias en la Universidad de

Malaya, Malasia en el que se estudiaron los efectos de la concentración inicial y el tiempo de contacto, pH y la temperatura sobre la biosorción de plomo (II) por la biomasa de alga muerta *Spyrogira neglecta* y tuvo como resultados que la capacidad máxima de adsorción de plomo (II) se vio afectada por la concentración inicial, aumentó con el pH y la temperatura de la solución de plomo (II). La capacidad de adsorción máxima (Q.máx) de plomo (II) por la biomasa no viviente de *Spyrogira neglecta* fue de 132 mg/g. El análisis FTIR de la biomasa alga reveló la presencia de amina y el grupo carboxilo que eran responsables de la adsorción de plomo (II).

Por su parte, YAQUB *et al.* (2012) estudió la absorción de cromo hexavalente (Cr VI) utilizando biomasa muerta de *Spyrogira sp.* y reportó como resultados la biosorción óptima de Cr (VI) a pH 4,0 (265 mg / g), la concentración de biomasa de 1 mg / g y la temperatura de 303K. El análisis de espectros de FTIR indicó la presencia y función de los grupos funcionales electronegativos en la superficie de las algas responsables de la unión de los iones de Cr (VI).

2.8.2. Investigaciones nacionales

En el 2006 en nuestro país se realizó estudios con algas marinas en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en el que se investiga la biosorción de Co (II) a partir de soluciones diluidas, usando como bioadsorbente al alga marina parda *Macrosytis pyrifera*. Los resultados experimentales muestran que los parámetros óptimos para el proceso de biosorción son: pH=5, tamaño de partícula menor de < 180 um y cantidad de biomasa de 0,3 g. Además, del estudio de la cinética del proceso de biosorción

se determinó que el tiempo óptimo es de 1,5 horas. Se usó la ecuación de Langmuir arrojando como resultado que la capacidad máxima de biosorción es 47,80 mg/g y la constante $b=0,0114$ (RABANAL, 2006).

Asimismo, en enero del 2012, se evaluó en la Universidad Nacional del Callao, la eficacia de la biosorción de plomo mediante Cochayuyo pretratado (*Chondracanthus chamissoi*) cuyos resultados mostraron que ésta especie es un biosorbente eficaz, en la fase de vida esporofítica y el tratamiento del alga con cloruro de calcio (CaCl_2), tamaño de partícula menor a 75 μm , presentó resultados óptimos para la biosorción del Pb (II) con una capacidad de biosorción de 111,72 mg/g (SICCHA, 2012).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

3.1.1. Ubicación política

El presente trabajo de investigación se desarrolló en las instalaciones del laboratorio de Microbiología General (Facultad de Recursos Naturales Renovables) y en el laboratorio de Análisis de Suelos (Facultad de Agronomía) de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, políticamente ubicado en la ciudad de Tingo María, distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco. La ejecución del proyecto de investigación se realizó a partir del mes de Mayo hasta Noviembre del año 2013.

3.2. Materiales y equipos

3.2.1. Materiales

Los materiales que se usaron para la ejecución de la presente investigación fueron los siguientes:

- Tubos de ensayo
- Crisoles
- Pinzas metálicas
- Embudos de vidrio
- Vasos precipitados de 1 L.
- Fiolas de 50 ml y 100 ml
- Matraces Erlenmeyer de 2 l

- Frascos de vidrio
- Agitador
- Probeta de 1 l
- Micropipetas
- Pipetas graduadas
- Picetas
- Papel filtro N°-40
- Gradillas metálicas
- Láminas porta y cubre objeto
- Guantes de cuero y de látex.
- Mascarillas

3.2.2. Material biológico

Spyrogira sp.

3.2.3. Equipos y reactivos usados

Los equipos usados fueron:

- Microscopio binocular, marca ZEISS.
- Espectrofotómetro de absorción atómica, marca Perkin Elmer, modelo 5000.
- Oxímetro, marca HANNA, modelo HI 9146.
- pH metro, marca SERENGO, modelo SG2.
- Termómetro, marca BRIXCO, modelo Digital de Punzón.
- Balanza analítica, marca METTLER, modelo AE 163.
- Estufa, marca MEMMERT, modelo ODH5 – 9240.

- Horno de mufla, marca WC Heraeus Hanau, modelo KR-170.
- Cámara digital marca SONY.
- GPS marca Garmin modelo Etrex 10.

Los reactivos usados fueron:

- Ácido clorhídrico (37%).
- Reactivo solvente, acetato de plomo laboratorios Merck.
- Disolvente, agua destilada.

3.3. Metodología

3.3.1. Identificación microscópica de las algas del genero *Spyrogira* antes y después del tratamiento.

Antes de la identificación microscópica se realizó la recolección de las algas de manera manual, se recolectó 0.8 kg de biomasa de alga *Spyrogira sp*, en pozas formadas por la desviación estacional del río Huallaga, en la ciudad de Huánuco, geográficamente presenta las siguientes coordenadas UTM: Norte 8895821, Este 364066. Ver ANEXO.

Las muestras tomadas se colocaron en frascos nuevos y estériles luego fueron trasladados al laboratorio de microbiología de la UNAS, donde se realizó la identificación microscópica y preservación del material biológico de acuerdo a la metodología adaptada de GUPTA y RASTOGI (2005) y OSPINA *et al.* (2006):

- Se eliminó los sedimentos e impurezas de las muestras colectadas, lavándolas con agua destilada.
- Se las secó en papel toalla absorbente.

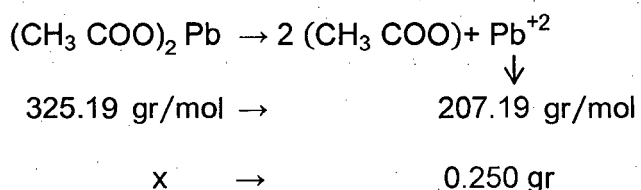
- Para la preservación de *Spyrogira sp.* se le proporcionó al agua dulce, caldo de macro y micro nutrientes en condiciones de luz y temperatura ambiente.

La identificación microscópica también se realizó al finalizar la exposición de las algas a las distintas concentraciones de plomo (50, 100, 150, 200 y 250 mg/l) para observar que cambios se habían presentado a consecuencia de la toxicidad.

3.3.2. Determinación de las concentraciones de Pb en el medio acuoso experimental

Las soluciones de Pb (II) de diferentes concentraciones: 50, 100, 150, 200 y 250 ppm, se obtuvieron a partir de la dilución de una solución estándar (392 mg de acetato de plomo en un litro de agua destilada).

Se determinó la cantidad de acetato de plomo, $(\text{CH}_3 \text{COO})_2 \text{Pb}$, a usar para la preparación de la solución estándar de la siguiente manera:



Por tanto la cantidad de acetato de plomo usada para la solución estándar de 250 ppm de Pb (II) fue:

$$x = 0.392 \text{ gr de } (\text{CH}_3 \text{COO})_2 \text{Pb}$$

Las concentraciones de Pb se determinaron a partir de la solución estándar de 250 ppm de Pb (dilución de 0.392 gr de acetato de plomo en agua destilada) de la siguiente manera:

- Para determinar una concentración de 50 ppm a un volumen de 700 ml, se utilizó un volumen de 140 ml de solución estándar y se enrasó con 560 ml de agua destilada.

$$C_1V_{C1} = C_2V_2$$

$$(250)V_{C1} = (50)(700\text{ml})$$

$$(392)V_{C1} = (78.4)(700\text{ml})$$

$$V_{C1} = 140 \text{ ml}$$

- Para determinar una concentración de 100 ppm a un volumen de 700 ml, se utilizó un volumen de 280 ml de solución estándar y se enrasó con 420 ml de agua destilada.

$$C_1V_{C2} = C_3V_3$$

$$(250)V_{C2} = (100)(700\text{ml})$$

$$(392)V_{C2} = (156.8)(700\text{ml})$$

$$V_{C2} = 280 \text{ ml}$$

- Para determinar una concentración de 150 ppm a un volumen de 700 ml, se utilizó un volumen de 420 ml de solución estándar y se enrasó con 280 ml de agua destilada.

$$C_1V_{C3} = C_3V_3$$

$$(250)V_{C3} = (150)(700\text{ml})$$

$$(392)V_{C3} = (235.2)(700\text{ml})$$

$$V_{C3} = 420 \text{ ml}$$

- Para determinar una concentración de 200 ppm a un volumen de 700 ml, se utilizó un volumen de 560 ml de solución estándar y se enrasó con 280 ml de agua destilada.

$$C_1V_{C4} = C_4V_4$$

$$(250)V_{C4} = (200)(700\text{ml})$$

$$(392)V_{C4} = (313.6)(700\text{ml})$$

$$V_{C4} = 560 \text{ ml}$$

- Para determinar una concentración de 250 ppm a un volumen de 700 ml, se utilizó un volumen de 700 ml de solución estándar.

$$C_1V_{C5} = C_5V_5$$

$$(250)V_{C5} = (250)(700\text{ml})$$

$$(392)V_{C5} = (392)(700\text{ml})$$

$$V_{C5} = 700 \text{ ml}$$

3.3.3. Determinación de las concentraciones de Pb en la biomasa de *Spyrogira sp.* antes y después del tratamiento

Para determinar la bioacumulación de plomo, se realizaron cuatro repeticiones del experimento, realizándose el mes de junio, el primer análisis y el último análisis en el mes de setiembre.

Los tratamientos se prepararon de la siguiente forma:

Cuadro 2. Determinación de los tratamientos.

Muestra	<i>Spyrogira sp.</i> (gr)	Solución metálica (ml)	Concentración de Pb (ppm)
Testigo	7	700	0
M1	7	700	50
M2	7	700	100
M3	7	700	150
M4	7	700	200
M5	7	700	250

Fuente: Elaboración propia.

Después de haberse cumplido el tiempo de contacto establecido (24 horas) entre el metal y la biomasa algal, ésta fue retirada para determinar la concentración de metal acumulado de la siguiente manera:

a. Preparación de la muestra

Antes del análisis químico, las muestras del tejido vegetal se sometieron a una fase de preparación según SALINAS y GARCIA (1985):

- Limpieza de la muestra para remover la contaminación superficial.
- Secado de la muestra a 70°C, para detener las reacciones enzimáticas que puedan ocurrir en ella, a peso constante para obtener un valor uniforme que sirva de base para referir los resultados analíticos.

b. Obtención del extracto vegetal

Este extracto resultó de la digestión en seco de la muestra, método propuesto por DIAZ y HUNTER (1982) y SALINAS y GARCIA (1985). Se describe a continuación el proceso:

- Las muestras secas a peso constante (rotuladas en crisoles) fueron llevadas a incinerar de seis a diez horas en una mufla a una temperatura de 475 a 500 °C.
- Se dejó enfriar las muestras en la mufla y después se colocaron en un desecador.
- Se retiró las muestras del desecador y se humedecieron con agua destilada.
- Luego se agregó 2 ml de HCL concentrado y 2 ml de agua destilada.

- Se llevó a evaporar muy lentamente en una plancha caliente.
- Se agregó 2 ml de HCL concentrado y 2 ml de agua destilada.
- Se llevó a evaporar muy lentamente en una plancha caliente.
- Finalmente se agregó 2 ml de HCL concentrado.
- Se llevó a evaporar muy lentamente en baño de maría o en una plancha caliente.
- Cuando se enfrió la cápsula de porcelana, se le añadió 10 ml de agua destilada caliente y se frotaron sus paredes con un agitador de vidrio protegido en un extremo con un tubo de goma.
- El contenido se filtró con un papel filtro Whatman N° 40, recogiéndolo en una fiola de 100 ml.
- Se enrasó la disolución con agua destilada, mezclándola bien después.
- Para determinar el Pb se tomaron partes alícuotas de la solución preparada, se tomó 0.1 ml de muestra y se enrasó a 10 ml.
- Las muestras se analizaron a través del espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer 5000), los resultados se registraron en mg/l.

c. Determinación de las concentraciones

Una vez determinadas las concentraciones en ppm se realizaron los cálculos que se presentan en el ANEXO.

3.3.4. Determinación de la concentración finales de plomo (II) en el medio acuoso experimental

Las concentraciones de plomo residuales en los medios acuosos experimentales fueron determinadas al finalizar los tratamientos de acuerdo a los métodos estándar, el equipo utilizado fue un espectrofotómetro de absorción atómica de flama (Perkin Elmer 5000) con límite mínimo de detección de 0.05 ppm para plomo y con una longitud de onda de 283.3 nm, método 7420 (MODHER *et al.*, 2009) los resultados se registraron en mg/l.

3.3.5. Determinación del grado de eficiencia en la bioacumulación de Pb por el alga *Spyrogira sp.*

Luego de haber determinado las diferentes concentraciones del metal pesado en las muestras, se calculó la eficiencia de bioacumulación de plomo mediante la correlación porcentual entre la concentración inicial y final de Pb presente en cada una, según la fórmula (MANE *et al.*, 2012):

$$Eb = \left(\frac{Ci - Cf}{Ci} \right) \times 100$$

Dónde:

Eb: Eficiencia de bioacumulación (%)

Ci: Concentración inicial de Pb (mg)

Cf: Concentración final de Pb (mg)

3.3.6. Registrar los datos de temperatura y pH antes y después de los tratamientos

Lobban y Harrison (1994) y Wang y Lewis (1997) citados por OSPINA *et al.* (2006) consideran que existen factores físicos que afectan el rendimiento de acumulación de metales, entre los que se encuentran: la temperatura y el pH razón por la que se elaboró un registro de éstos.

Parámetros de control en el experimento:

- Tiempo de equilibrio

Se registró el tiempo de contacto entre la biomasa y la solución que contuvo al ión metálico, a fin de conocer el tiempo de residencia necesaria para la máxima bioacumulación del metal por *Spyrogira sp.*

- pH

Se utilizó un potenciómetro o pH metro calibrado para la determinación del pH al final del experimento.

- Temperatura

La temperatura interna de operación se midió al inicio y al final del experimento con termómetro digital.

3.4. Unidades y variables experimentables

3.4.1. Unidad experimental

La unidad en estudio fue el alga *Spyrogira sp.* con capacidad de bioacumular plomo.

3.4.2. Variable dependiente

La variable dependiente es:

- Eficiencia de bioacumulación de plomo (EFPb).

3.4.3. Variables independientes

Las variables independientes son:

- Concentración de plomo (C1, C2, C3, C4, C5) en mg/L.

3.5. Diseño estadístico

Se utilizó un diseño de estímulo creciente, mediante el cual se realizaron comparaciones entre 5 diferentes concentraciones de plomo (C1: 50 mg/L, C2: 100 mg/L, C3: 150 mg/L, C4: 200 mg/L y C5: 250 mg/L) con una determinada cantidad de biomasa (7000 mg) y en forma seriada (cuatro repeticiones). Evaluándose de tal manera la eficiencia de bioacumulación (EFI) según el siguiente esquema:

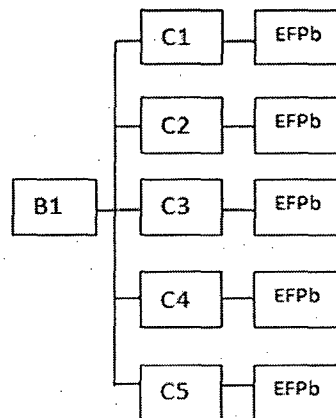


Figura 7. Diseño estadístico.

Leyenda:

[B1]: biomasa;

[C1]: 50 mg pb/L,

[C2]: 100 mg pb/L,

[C3]: 150 mg pb/L,

[C4]: 200 mg pb/L,

[C5]: 250 mg pb/L,

[EFI]: Eficiencia de bioacumulación.

Cuadro 3. Descripción de los tratamientos en estudio.

Tratamiento	Concentración de Pb (mg/L)	Cantidad de biomasa (mg)	Repeticiones
T1	50	7000	4
T2	100	7000	4
T3	150	7000	4
T4	200	7000	4
T5	250	7000	4

Fuente: Elaboración propia.

3.6. Análisis estadístico

3.6.1. Análisis de varianza

Se distribuyeron las variables estadísticas de acuerdo al diseño descriptivo para un modelo estadístico completamente al azar (DCA) con cuatro repeticiones, utilizando el programa SPSS V15.0 en español, para un nivel de significación del 5%.

Cuadro 4. Análisis de Variancia (ANOVA)

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Signif
Tratamientos	t - 1	ST - e	SCtrat/GLtrat	CMtrat/CMe	Fc > Ft
Error	t(r-1)	SCT-SCtrat	SCerror/GLe		
TOTAL	t.r-1				

Fuente: Elaboración propia.

3.6.2. Modelo Aditivo Lineal

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ik} = Es la respuesta obtenida en la k - ésima observación a la cual se le aplica, el i-ésimo tratamiento al alga.

μ = Efecto de la media general.

B_i = Es el efecto del i – ésimo tratamiento al alga.

ε_{ik} = Es el efecto aleatorio del error experimental

Para:

$i = 1, 2, 3, 4, 5$ tratamientos al alga.

$k = 1, 2, 3, 4$ observaciones.

3.6.3. Prueba HSD Tukey

Se empleó la Diferencia Francamente Significativa de Tukey (HSD Tukey) a fin de determinar diferencias significativas de bioacumulación de plomo entre medias de tratamientos, para un nivel de significación del 5%, utilizando el programa SPSS V15.0 en español.

IV. RESULTADOS

4.1. Identificar microscópicamente las algas del género *Spyrogira* antes y después del tratamiento.

Las figuras mostradas a continuación son algas del género *Spyrogira*, éstas fueron identificadas microscópicamente en el Laboratorio de Microbiología de la UNAS.

Las algas identificadas son mucosas al tacto además poseen tres cloroplastos parietales acintados con numerosos pirinoides



Figura 8. *Spyrogira* sp.

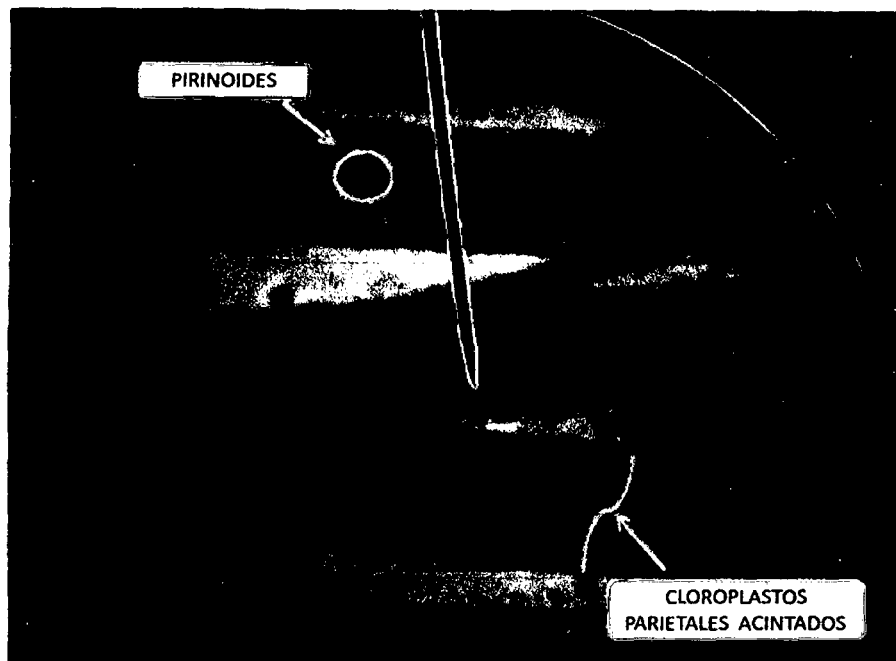


Figura 9. Células de *Spyrogira* sp.

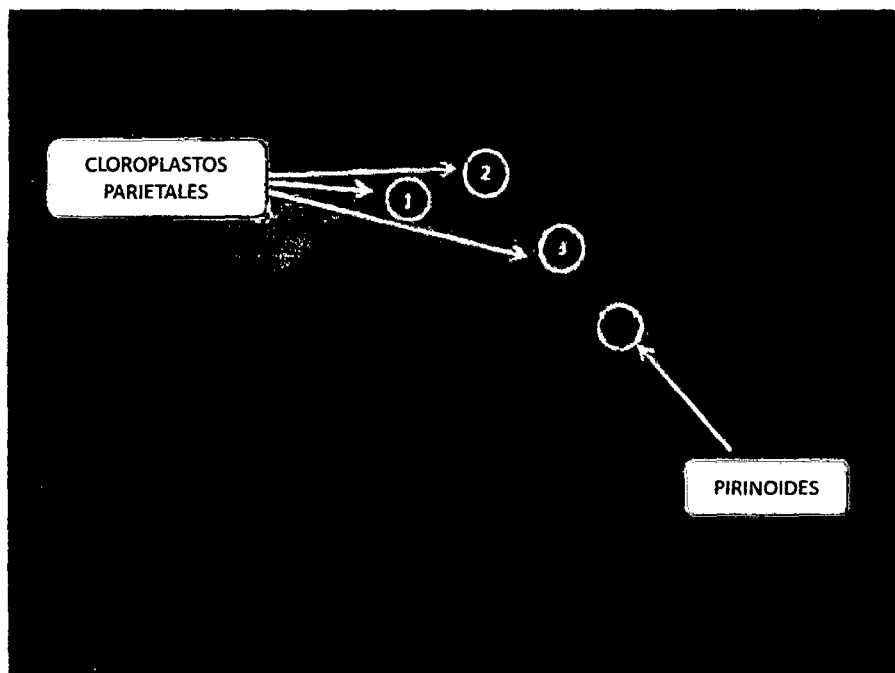


Figura 10. *Spyrogira* sp. ; (1, 2 y 3) tres cloroplastos parietales acintados provistos de numerosos pirinoides.

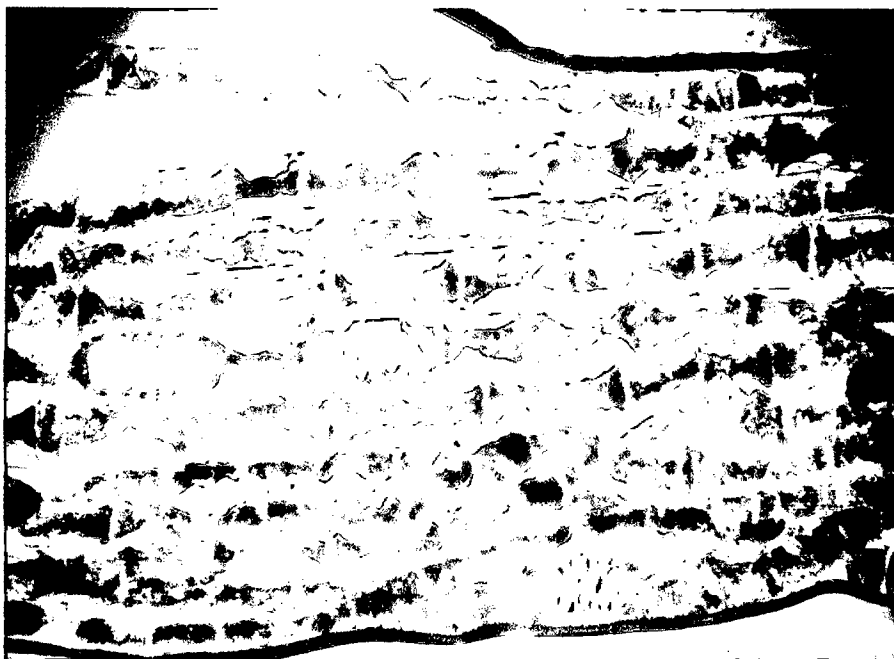


Figura 11. Observación microscópica de *Spyrogira* sp. después de la exposición.

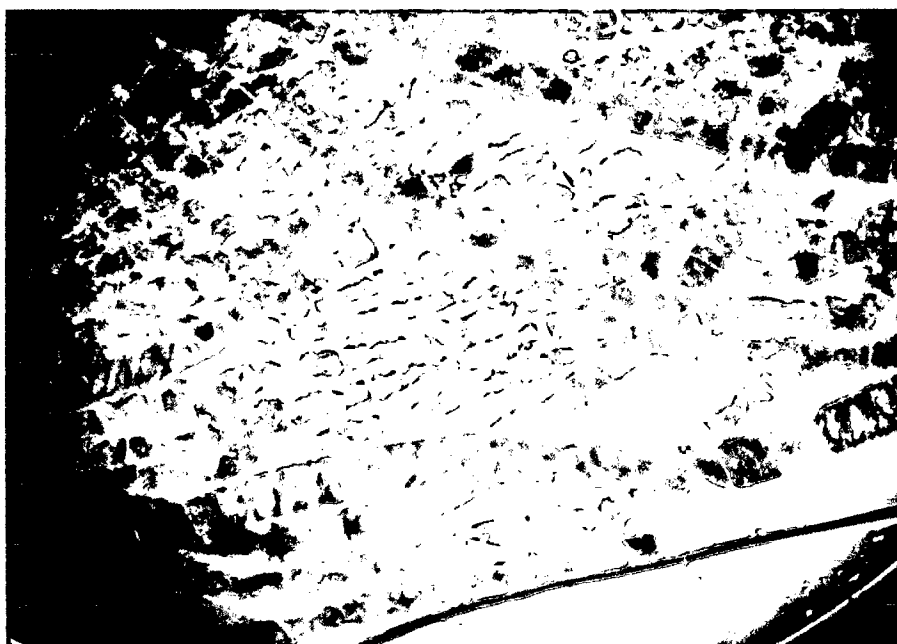


Figura 12. Observación microscópica de *Spyrogira* sp. después de la exposición.

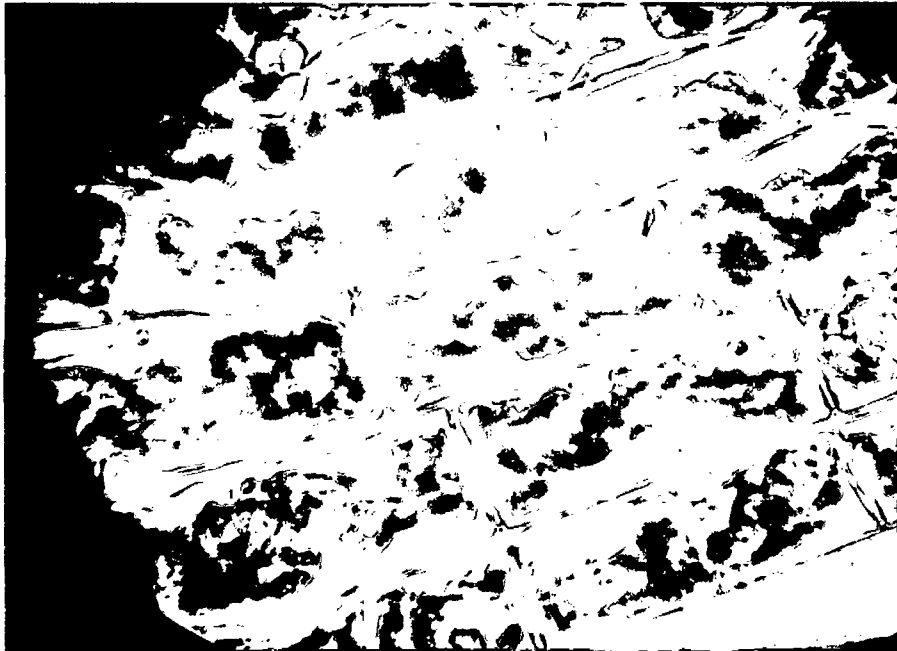


Figura 13. Células de *Spyrogira* sp. carentes de cloroplastos parietales definidos.

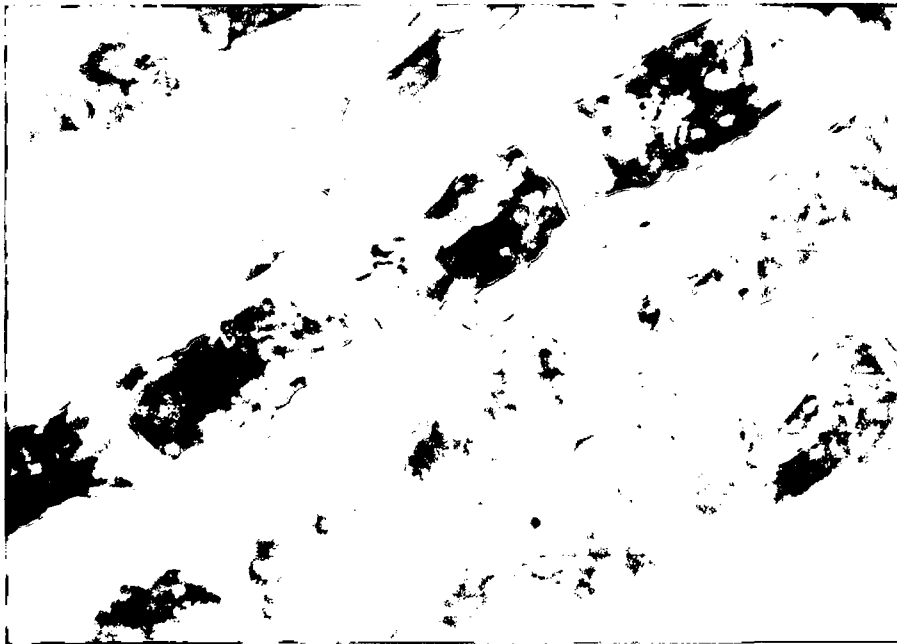


Figura 14. Células de *Spyrogira* sp. carentes de cloroplastos parietales definidos.

4.2. Determinación de las concentraciones de Pb en la biomasa de *Spyrogira sp* antes y después del tratamiento.

Las concentraciones de plomo en la biomasa antes de los cuatro tratamientos se muestran en el Cuadro 5:

Cuadro 5. Concentraciones de Plomo determinadas en la biomasa de *Spyrogira sp.* antes de los tratamientos.

Concentraciones de Pb (mg/l) determinadas en la biomasa inicial				
Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Promedio
0	0	0	0	0

Fuente: Elaboración propia.

El Cuadro 6 muestra las concentraciones de Pb determinadas en la biomasa al finalizar las cuatro repeticiones. Se observa un aumento progresivo de las concentraciones de iones plomo acumuladas por algas del género *Spyrogira sp.*, la bioacumulación aumentó con el tiempo de exposición al metal correspondiendo a los periodos más cortos de exposición los valores menores de acumulación y los máximos valores de acumulación de plomo en los ensayos se obtuvieron durante 24 horas de exposición.

Cuadro 6. Concentraciones de plomo determinadas en la biomasa de *Spyrogira* sp. expuesta a concentraciones metálicas de plomo (50, 100, 150, 200 y 250 mg/l).

Tiempo	Concentraciones		Concentraciones de Pb (mg)					
	ppm	mg	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Promedio	
T1 1h	C1	50	35	10.50	14.30	12.30	11.15	12.06
	C2	100	70	26.50	24.10	24.90	25.00	25.13
	C3	150	105	68.00	77.60	73.10	73.80	73.13
	C4	200	140	83.90	87.85	84.25	82.10	84.53
	C5	250	175	98.40	100.50	96.15	78.10	93.29
T2 2h	C1	50	35	11.00	8.80	16.50	16.10	13.10
	C2	100	70	34.15	36.00	29.00	32.30	32.86
	C3	150	105	78.40	83.60	78.60	81.30	80.48
	C4	200	140	97.60	102.80	90.90	106.70	99.50
	C5	250	175	120.90	90.85	102.85	122.80	109.35
T3 6h	C1	50	35	13.00	15.90	14.20	15.20	14.58
	C2	100	70	43.50	48.90	50.10	51.10	48.40
	C3	150	105	96.50	89.00	92.40	87.70	91.40
	C4	200	140	113.10	109.00	118.60	104.20	111.23
	C5	250	175	132.20	129.10	132.10	127.20	130.15
T4 12h	C1	50	35	22.00	23.80	25.20	24.00	23.75
	C2	100	70	62.00	60.45	61.00	56.00	59.86
	C3	150	105	97.10	98.40	99.10	98.00	98.15
	C4	200	140	127.90	116.00	115.00	129.30	122.05
	C5	250	175	160.40	148.00	138.00	137.10	145.88
T5 24h	C1	50	35	19.50	24.90	22.00	19.30	21.43
	C2	100	70	56.30	55.20	52.00	48.50	53.00
	C3	150	105	101.00	91.00	93.00	95.60	95.15
	C4	200	140	128.70	115.20	120.60	131.10	123.90
	C5	250	175	151.90	143.00	149.10	152.10	149.03

Fuente: Elaboración propia.

4.3. Determinación de las concentraciones finales de Pb en los medios acuosos después del tratamiento.

Los resultados de las concentraciones de plomo en los medios acuosos residuales del tratamiento se muestran en el Cuadro 7, donde se observa que las concentraciones residuales aumentan en proporción a las concentraciones iniciales determinadas.

Cuadro 7. Concentraciones de plomo determinadas en los medios acuosos después del tratamiento a 24 horas de exposición en concentraciones de plomo de 50, 100, 150, 200 y 250 mg/l.

	Concentración		Concentraciones residuales de Pb (mg)			
			Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4
C1	50	35	3.10	3.40	4.50	3.90
C2	100	70	7.40	7.80	7.60	8.30
C3	150	105	18.20	21.00	17.30	18.60
C4	200	140	27.30	29.20	28.10	28.70
C5	250	175	34.10	35.40	32.80	33.50

Fuente: Elaboración propia.

4.4. Determinación del grado de eficiencia en la bioacumulación de Pb por el alga *Spyrogira sp.*

Los resultados de la relación porcentual de la acumulación del metal en las algas con respecto a la concentración inicial de exposición, revelaron que en general a menores concentraciones del metal se alcanzaron mayores porcentajes de eficiencia de acumulación en el alga Cuadro 8. El mayor porcentaje de eficiencia de acumulación de plomo en *Spyrogira sp* se alcanzó en los tratamientos con 150 ppm, las algas expuestas a las cinco diferentes concentraciones de metal presentaron una rápida absorción durante las 12 primeras horas de exposición, seguida por una absorción más lenta. En el Cuadro 8 se muestra los resultados del porcentaje de eficiencia de

bioacumulación de plomo obtenido en cada una de las cuatro pruebas realizadas, también se detalla el promedio de porcentajes de eficiencia.

Cuadro 8. Porcentaje de eficiencia de bioacumulación promedio de plomo en *Spyrogira sp.* en diferentes tiempos de exposición y a diferentes concentraciones de plomo 50, 100, 150, 200 y 250 (mg/l).

Tiempo	Concentraciones		Eficiencia de Bioacumulación de Pb (%)					
	ppm	mg	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Promedio	
T1 1h	C1	50	35	30.00	40.86	35.14	31.86	34.46
	C2	100	70	37.86	34.43	35.57	35.71	35.89
	C3	150	105	64.76	73.90	69.62	70.29	69.64
	C4	200	140	59.93	62.75	60.18	58.64	60.38
	C5	250	175	56.23	57.43	54.94	44.63	53.31
T2 2h	C1	50	35	31.43	25.14	47.14	46.00	37.43
	C2	100	70	48.79	51.43	41.43	46.14	46.95
	C3	150	105	74.67	79.62	74.86	77.43	76.64
	C4	200	140	69.71	73.43	64.93	76.21	71.07
	C5	250	175	69.09	51.91	58.77	70.17	62.49
T3 6h	C1	50	35	37.14	45.43	40.57	43.43	41.64
	C2	100	70	62.14	69.86	71.57	73.00	69.14
	C3	150	105	91.90	84.76	88.00	83.52	87.05
	C4	200	140	80.79	77.86	84.71	74.43	79.45
	C5	250	175	75.54	73.77	75.49	72.69	74.37
T4 12h	C1	50	35	62.86	68.00	72.00	68.57	67.86
	C2	100	70	88.57	86.36	87.14	80.00	85.52
	C3	150	105	92.48	93.71	94.38	93.33	93.47
	C4	200	140	91.36	82.86	92.36	93.43	90.00
	C5	250	175	91.66	84.57	78.86	78.34	83.36
T5 24h	C1	50	35	55.71	71.14	62.86	55.14	61.21
	C2	100	70	80.43	78.86	74.29	69.29	75.71
	C3	150	105	94.19	86.67	88.57	91.05	90.62
	C4	200	140	91.93	82.29	86.14	93.64	88.50
	C5	250	175	86.80	81.71	85.20	86.91	85.16

Fuente: Elaboración propia.

4.5. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante la aplicación del programa SPSS V15 en español, para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los efectos de los tratamientos y la prueba de Tukey para determinar en cuales de los tratamientos se han producido las diferencias. Obteniendo los resultados de acuerdo a los tiempos de exposición:

Tiempo 1

El análisis de varianza para los promedios de eficiencia de bioacumulación de Pb encontrados luego de una hora de tiempo de contacto (Cuadro 9), muestra que existe significancia estadística entre los tratamientos a distintas concentraciones de plomo, con valores de significancia menores que 0.05, con un 95% de nivel de confianza.

Cuadro 9. ANOVA. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3768.214	4	942.054	61.708	.000
Intra-grupos	228.993	15	15.266		
Total	3997.207	19			

Fuente: Elaboración propia.

Al existir significancia estadística entre tratamientos, se determinó mediante la prueba HSD de Tukey que la comparación de la influencia de las distintas concentraciones de plomo sobre la eficiencia de bioacumulación fue heterogénea: las concentraciones de 50 ppm y 100 ppm tienen efectos diferentes respecto a concentraciones de 150, 200 y 250 ppm; las concentraciones de 200 ppm y 250 ppm tienen efectos diferentes respecto a concentraciones de 50, 100 y 150 ppm; mientras que la concentración de 150

ppm tiene efectos distintos y mayores de bioacumulación respecto a las demás concentraciones (Cuadro 10 y Figura 15).

Cuadro 10. HSD de Tukey. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo.

Concentraciones mg/l	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
50.00	4	34.4650		
100.00	4	35.8925		
250.00	4		53.3075	
200.00	4		60.3750	
150.00	4			69.6425
Sig.		.984	.129	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000.

Fuente: Elaboración propia

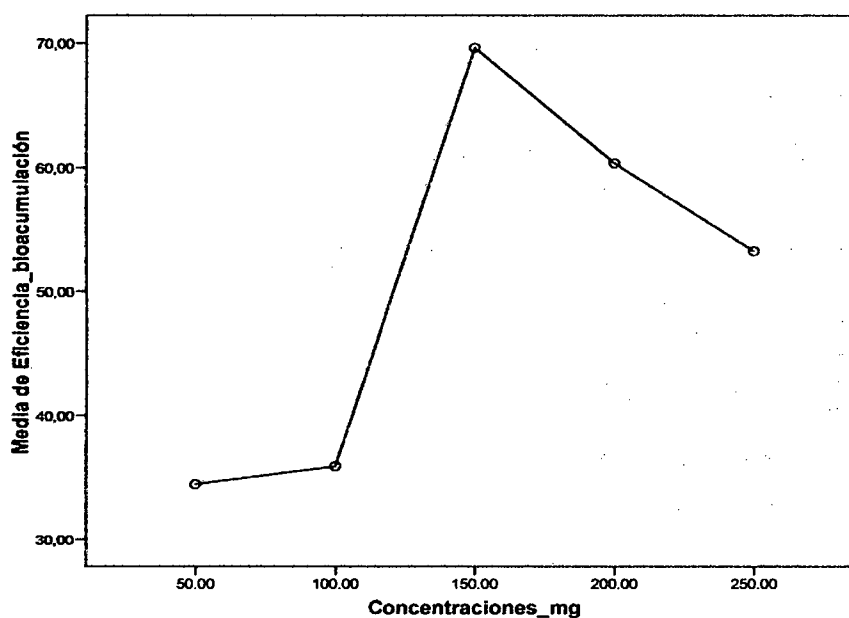


Figura 15. Gráfico de las medias.

Tiempo 2

El análisis de varianza para los promedios de eficiencia de bioacumulación de plomo encontrado luego de dos horas de tiempo de contacto (Cuadro 11), muestra que existe significancia estadística entre los tratamientos a distintas concentraciones de plomo, con valores de significancia menores que 0.05, con un 95% de nivel de confianza.

Cuadro 11. ANOVA. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4319.102	4	1079.776	22.317	.000
Intra-grupos	725.765	15	48.384		
Total	5044.867	19			

Fuente: Elaboración propia

Mediante la prueba HSD de Tukey se determinó que la influencia de las distintas concentraciones de plomo sobre la eficiencia de bioacumulación fue heterogénea (Cuadro 12 y Figura 16), por tanto hay un riesgo de 5% al decir que hay diferencias significativas en la eficiencia de bioacumulación de plomo entre las concentraciones de 50 ppm y 150 ppm y al decir que no hay diferencias significativas de eficiencia en concentraciones de 250, 200 y 150 ppm, existiendo mayor eficiencia a concentración de 150 ppm.

Cuadro 12. HSD de Tukey. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo.

Concentraciones mg/l	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
50.00	4	37.4275	
100.00	4	46.9475	
250.00	4		62.4850
200.00	4		71.0700
150.00	4		76.6450
Sig.		.342	.073

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000.

Fuente: Elaboración propia

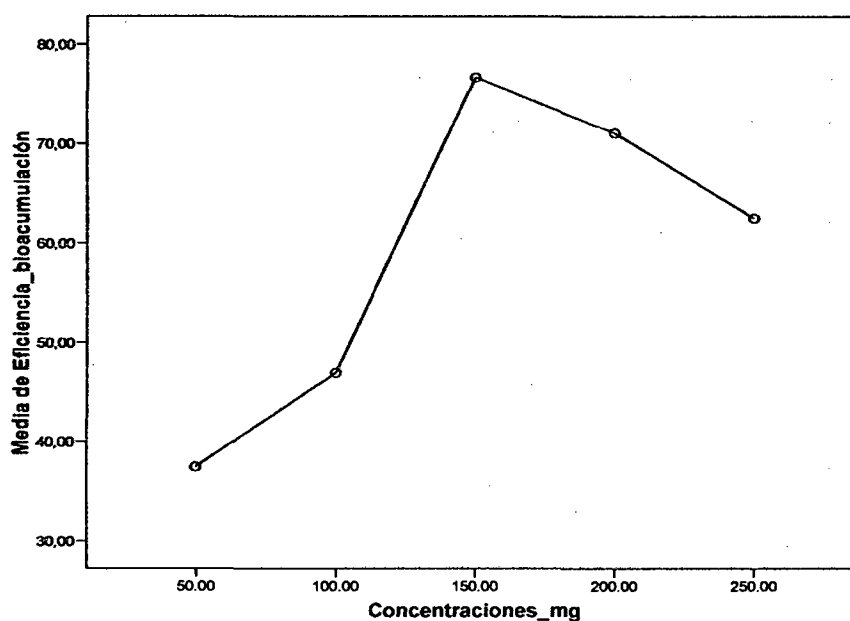


Figura 16. Gráfico de medias.

Tiempo 3

El análisis de varianza para los promedios de eficiencia de bioacumulación de plomo encontrado luego de seis horas de tiempo de contacto (Cuadro 13), muestra que existe significancia estadística entre los tratamientos a distintas concentraciones de plomo, con valores de significancia menores que 0.05, con un 95% de nivel de confianza.

Cuadro 13. ANOVA. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4812.979	4	1203.245	84.177	.000
Intra-grupos	214.413	15	14.294		
Total	5027.392	19			

Fuente: Elaboración propia

La prueba HSD de Tukey determinó que la influencia de las distintas concentraciones de plomo sobre la eficiencia de bioacumulación fue heterogénea: la concentración de 50 ppm tiene efectos diferentes respecto a

concentraciones de 100, 150, 200 y 250 ppm; la de 100 ppm tiene efectos diferentes respecto a concentraciones de 50, 150 y 200 ppm; la de 200 ppm tiene efectos diferentes respecto a concentraciones de 50, 100 y 250 ppm; la de 250 ppm tiene efectos diferentes respecto a concentraciones de 50, 100 y 150 ppm, mientras que la de 150 ppm tiene efectos mayores de bioacumulación respecto a las otras concentraciones (Cuadro 14 y Figura 17).

Cuadro 14. HSD de Tukey. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo.

Concentraciones mg/ml	N	Subconjunto para alfa = .05			
		2	3	4	1
50.00	4	41.6425			
100.00	4		69.1425		
250.00	4		74.3725	74.3725	
200.00	4			79.4475	79.4475
150.00	4				87.0450
Sig.		1.000	.332	.359	.079

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000.

Fuente: Elaboración propia

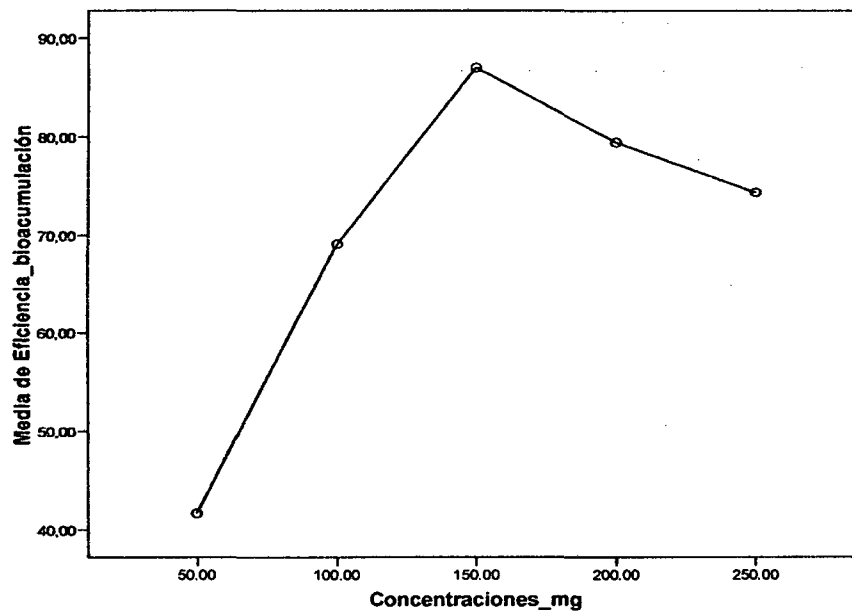


Figura 17. Gráfico de las medias.

Tiempo 4

El análisis de varianza para los promedios de eficiencia de bioacumulación de plomo encontrado luego de 12 horas de tiempo de contacto (Cuadro 15), muestra que existe significancia estadística entre los tratamientos a distintas concentraciones de plomo, con valores de significancia menores de 0.05, a un 95% de nivel de confianza.

Cuadro 15. ANOVA. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1447.276	4	1447.276	18.598	.000
Intra-grupos	291.825	15	291.825		
Total	1739.100	19			

Fuente: Elaboración propia

La prueba HSD de Tukey determinó que la influencia de las distintas concentraciones de plomo sobre la eficiencia de bioacumulación fue heterogénea: la concentración de 50 ppm tiene efectos diferentes respecto a concentraciones de 100, 150, 200 y 250 ppm; la de 100 ppm tiene efectos diferentes respecto a concentraciones de 50 y 150 ppm; la de 250 ppm tiene efectos diferentes respecto a concentraciones de 50 y 150 ppm; mientras que la de 150 ppm tiene efectos mayores de bioacumulación respecto a las demás concentraciones (Cuadro 16 y Figura 18).

Cuadro 16. HSD de Tukey. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo.

Concentraciones	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
50.00	4	67.8575		
250.00	4		83.3575	
100.00	4		85.5175	85.5175
200.00	4		87.1800	87.1800
150.00	4			93.4750
Sig.		1.000	.737	.131

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000

Fuente: Elaboración propia.

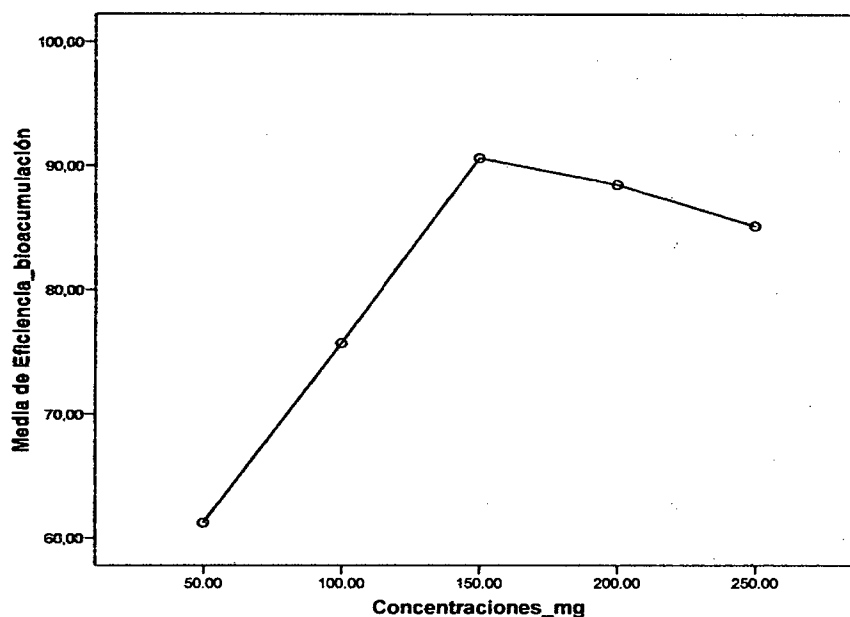


Figura 18. Gráfico de las medias.

Tiempo 5

El análisis de varianza para los promedios de eficiencia de bioacumulación de plomo encontrado luego de 24 horas de tiempo de contacto (Cuadro 17), muestra que existe significancia estadística entre los tratamientos a distintas concentraciones de plomo, con valores de significancia menores que 0.05, con un 95% de nivel de confianza.

Cuadro 17. ANOVA. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2330.512	4	582.628	22.134	.000
Intra-grupos	394.845	15	26.323		
Total	2725.357	19			

Fuente: Elaboración propia

La Prueba HSD de Tukey determinó que la comparación de influencia de las distintas concentraciones de plomo sobre la eficiencia de bioacumulación fue heterogénea: la concentración de 50 ppm tiene efectos

diferentes respecto a concentraciones de 100, 150, 200 y 250 ppm; la concentración de 100 ppm tiene efectos diferentes respecto a concentraciones de 50, 150 y 200 ppm; las concentraciones de 250, 200 y 150 ppm tienen efectos diferentes respecto a concentraciones de 50 y 100 ppm; siendo la concentración de 150 ppm la que tiene efectos mayores de bioacumulación respecto a las otras concentraciones (Cuadro 18 y Figura 19).

Cuadro 18. HSD de Tukey. Eficiencia de Bioacumulación de Plomo.

Concentraciones_mg	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
50.00	4	61.2125		
100.00	4		75.7175	
250.00	4		85.1550	85.1550
200.00	4			88.5000
150.00	4			90.6200
Sig.		1.000	.120	.574

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000

Fuente: Elaboración propia.

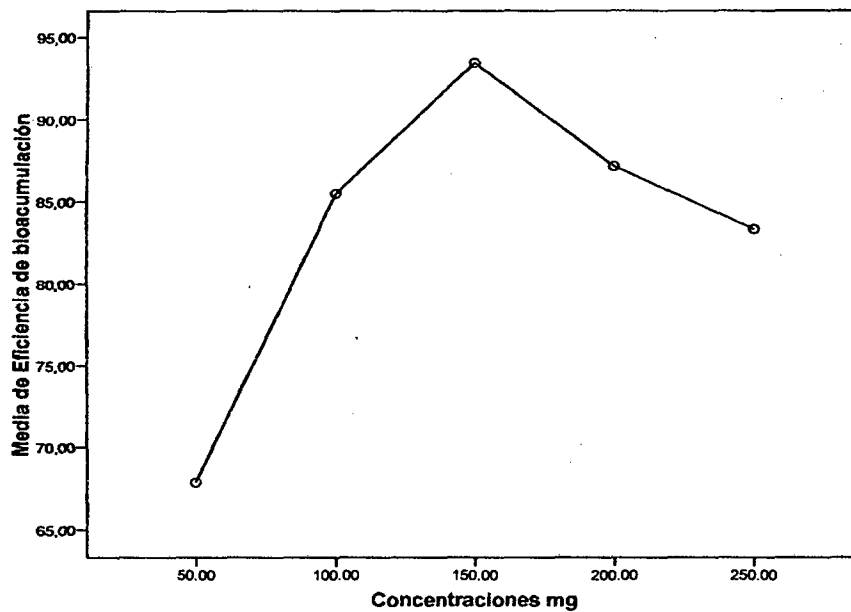


Figura 19. Gráfico de las medias.

4.6. Registrar los datos de temperatura y pH antes y después de los tratamientos.

- Temperatura

El cuadro 19 muestra el registro del promedio de las temperaturas tomadas en los medios líquidos de cada tratamiento, al inicio del experimento y al final del mismo, notándose que la temperatura final es mayor que la temperatura inicial del experimento y disminuyen a medida que aumenta la concentración del ion metálico en el medio.

Cuadro 19. Registro de variación de temperaturas.

Tiempo (horas)	Concentración	Variación de T°			
		Promedio		T° Inicial	T° Final
		ppm	mg		
T1 (1 h)	C1	50	35	24.48	25.78
	C2	100	70	24.20	25.55
	C3	150	105	24.00	24.70
	C4	200	140	23.80	24.50
	C5	250	175	23.55	24.30
T2 (2 h)	C1	50	35	24.48	25.53
	C2	100	70	24.20	25.08
	C3	150	105	24.00	24.75
	C4	200	140	23.80	24.68
	C5	250	175	23.55	24.50
T3 (6 h)	C1	50	35	24.48	25.43
	C2	100	70	24.20	25.13
	C3	150	105	24.00	24.98
	C4	200	140	23.80	24.83
	C5	250	175	23.55	24.85
T4 (12 h)	C1	50	35	24.48	25.15
	C2	100	70	24.20	24.90
	C3	150	105	24.00	24.90
	C4	200	140	23.80	24.83
	C5	250	175	23.55	24.68
T5 (24 h)	C1	50	35	24.48	25.03
	C2	100	70	24.20	24.83
	C3	150	105	24.00	24.78
	C4	200	140	23.80	24.65
	C5	250	175	23.55	24.53
Control				25.03	25.38

Fuente: Elaboración propia

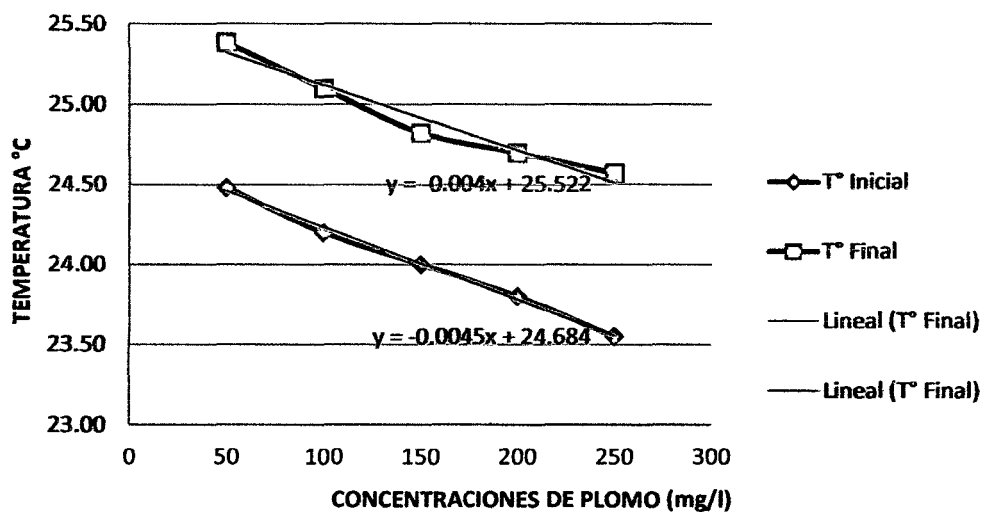


Figura 20. Disminución de la temperatura a medida que aumenta la concentración del ion metálico en el medio.

pH

El Cuadro 20 muestra el registro promedio de pH inicial y final tomados a los medios líquidos de los tratamientos durante las cuatro repeticiones, notándose una disminución de pH al final del experimento el mismo que disminuye según aumenta la concentración del ion metálico en el medio.

Cuadro 20. Registro de variación del pH.

Tiempo (horas)	Concentración de Pb		Variación de pH		
			Promedio		
	ppm	mg	pH Inicial	pH Final	
T1 (1 h)	C1	50	35	7.63	7.43
	C2	100	70	7.40	7.25
	C3	150	105	7.09	6.81
	C4	200	140	6.67	6.50
	C5	250	175	6.22	6.13
T2 (2 h)	C1	50	35	7.63	7.48
	C2	100	70	7.40	7.24
	C3	150	105	7.09	7.07
	C4	200	140	6.67	6.64
	C5	250	175	6.22	6.19
T3 (6 h)	C1	50	35	7.63	7.33
	C2	100	70	7.40	7.24
	C3	150	105	7.09	6.93
	C4	200	140	6.67	6.56
	C5	250	175	6.22	6.10
T4 (12 h)	C1	50	35	7.63	7.03
	C2	100	70	7.40	7.05
	C3	150	105	7.09	6.86
	C4	200	140	6.67	6.47
	C5	250	175	6.22	6.17
T5 (24 h)	C1	50	35	7.63	7.26
	C2	100	70	7.40	7.08
	C3	150	105	7.09	6.96
	C4	200	140	6.67	6.57
	C5	250	175	6.22	5.96
	Control			7.21	7.10

Fuente: Elaboración propia

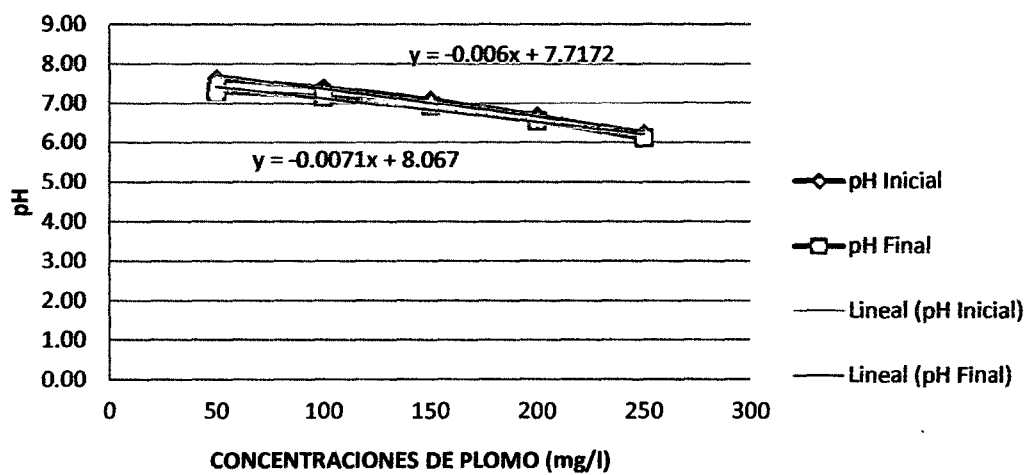


Figura 21. Variación del pH inversamente proporcional a las concentraciones de iones de Pb (II).

V. DISCUSIÓN

5.1. Identificar microscópicamente las algas del género *Spyrogira* antes y después del tratamiento.

Las algas recolectadas e identificadas fueron del género *Spyrogira sp.*, de consistencia mucosa al tacto, con células provistas de tres cloroplastos parietales acintados con numerosos pirinoides, las características descritas concuerdan con las dadas por STELL y TORRIE (1989) en relación a la descripción del género *Spyrogira sp.*

De acuerdo con Redd y Gadd (1989), citados por PEÑA *et al.* (2005) y lo observado en las figuras 9, 10, 11,12 se afirma que la toxicidad del plomo causó efectos negativos en las células de *Spyrogira sp.*, pues se observaron cambios en el volumen celular debido al incremento irreversible de la permeabilidad de la membrana plasmática que condujo a la pérdida de solutos en la célula; desarrollo morfológico anormal y cambios ultraestructurales (alteraciones celulares) y la degradación de pigmentos fotosintéticos. Esta toxicidad se debe al estrés oxidativo que causan los metales (Pilon, 2002, citado por PEÑA *et al.*, 2005), donde las especie química oxidante, el plomo, rebasó la capacidad de producción o la actividad de especies antioxidantes.

5.2. Determinación de las concentraciones de Pb en la biomasa de *Spyrogira sp.* antes y después del tratamiento.

El alga de género *Spyrogira sp.*, logró absorber diferentes concentraciones de iones de Pb^{+2} y de acuerdo con YAQUB *et al.* (2012), la acumulación se vio favorecida por la naturaleza bioquímica de la pared celular de las algas pues posee muchos grupos funcionales electronegativos, tales como grupos hidroxilo (OH), fosforilo (PO_3O_2), amina (NH_2), carboxilo (COOH), sulfhidrilo (SH), etc, que actuaron como sitios de atracción de metales acumulándose en las células del alga. Además NAVARRO *et al.* (2007) indica que los metales pesados tienen gran afinidad por estos grupos, por lo tanto el resultado de estas uniones es muy perjudicial para las células de *Spyrogira sp.* pues provocan en ella estrés oxidativo generando daños a nivel celular.

Ante esto las algas como mecanismo de defensa han desarrollado la capacidad de acumular metales pesados y básicamente se debe a que estas son capaces de generar una cantidad suficiente de fitoquelatinas (MONTORO, 2009) cuya síntesis se activa por exposición a iones metálicos las que según (CASTILLO y ROLDAN, 2005) intervienen en el confinamiento vacuolar de los metales pesados, acumulándose estos complejos metálicos en las vacuolas

En el Cuadro 5 se observó que la capacidad de bioacumulación de plomo en las células de *Spyrogira sp.*, aumenta conforme aumentó la concentración del medio al que estuvo expuesto, este comportamiento es justificado por Baker (2000); Levine (1984); Seeliger (1977) y Wilcox *et al.* (1998), citados por OSPINA *et al.* (2006) pues afirman que la acumulación de metales en especies de macro y micro algas se da en función a la

disponibilidad de los contaminantes. Por otro lado Yan y Pan (2002), citados por MANE y BHOSLE (2012) indican también que la acumulación de iones metálicos depende de la concentración de iones metálicos en la solución; por tanto el comportamiento que mostraron las algas *Spyrogira sp.*, fue el esperado respecto al proceso de bioacumulación pues mientras aumentaron las concentraciones, dadas a los tratamientos, aumento el proceso bioacumulación.

5.3. Determinación de las concentraciones finales de Pb en los medios acuosos después del tratamiento.

En el Cuadro 7 se pudo observar que a concentraciones mayores de plomo, 200 y 250 mg/l, existe mayor concentración de plomo residual debido a que a estas concentraciones hubo menor eficiencia de bioacumulación; mientras que a menores concentraciones de plomo, 50, 100 y 150 mg/l, se registró menores concentraciones residuales de plomo pues hubo mayor eficiencia a estos niveles de concentración de acuerdo a lo mencionado por Wang y Lewis (1997), citados por OSPINA *et al.* (2006) que afirman que la tasa de acumulación en el alga decrece con el incremento de la concentración del metal.

5.4. Determinación del grado de eficiencia en la bioacumulación de Pb por el alga *Spyrogira sp.*

El Cuadro 8, muestra que la eficiencia de bioacumulación no es proporcional al aumento de las concentraciones lo cual se debe según CASTILLO y ROLDAN (2005) a que la eficiencia aumenta con la concentración del metal hasta alcanzar una saturación.

Además la bioacumulación de iones de Pb^{+2} fue eficiente en la etapa inicial del tiempo de contacto con las diferentes concentraciones de plomo, logrando su mayor eficiencia en concentraciones de 150 ppm, en concentraciones mayores (200 ppm y 250 ppm) la eficiencia de bioacumulación disminuyó; lo cual según Chong *et al.* (2000) y Sánchez *et al.* (2001), citados por OSPINA *et al.* (2006), sucedió porque la acumulación de metales pesados se llevó a cabo en dos fases: la fase activa de acumulación, corresponde a la etapa inicial y es la fase rápida del proceso, se da cuando los metales son absorbidos a la superficie del alga por atracción electrostática a los sitios cargados negativamente y la fase pasiva, que es mucho más lenta, donde los iones metálicos son transportados a través de la membrana celular y dentro de los organelos intracelulares. Es decir la eficiencia de bioacumulación disminuyó debido a que después del tiempo de equilibrio el proceso de bioacumulación se dio de manera más lenta, pues el alga se saturó de iones de plomo de manera rápida debido a que durante la etapa inicial existían superficies disponibles cargadas negativamente en las paredes celulares de *Spyrogira sp.*, las cuales por atracción electrostática retuvieron a los cationes metálicos de plomo y en la fase pasiva la incorporación de plomo se realizó con participación de polisacáridos cargados en la pared celular y en la matriz intracelular

La eficiencia máxima de bioacumulación se registró en las primeras 12 horas, seguido por una tasa relativamente lenta hasta las 24 horas pues a pesar de haber 12 horas de diferencia la eficiencia de absorción de iones metálicos no fue significativa, por tanto a las 12 horas del tiempo de contacto entre la biomasa y las concentraciones, se logró el tiempo de equilibrio, debido

a que los sitios de unión de metales en la biomasa después de este tiempo se saturaron.

5.5. Registrar los datos de temperatura y pH antes y después de los tratamientos

El rendimiento de bioacumulación también se vio disminuido según Yan y Pan (2002), citados por MANE y BHOSLE (2012) por los efectos tóxicos generados por exceso de altas concentraciones y también por los factores externos (temperatura y pH) que afectaron el metabolismo celular de las *Spyrogira sp.*

Respecto al pH, Gabriel (1982) y Volesky (1987), citados por MODHER *et al.* (2009) afirman que la absorción de los metales por la biomasa está controlada por la atracción iónica por lo que a valores bajos, la superficie de la célula se carga positivamente, reduciendo la atracción entre los iones metálicos y los grupos funcionales de la pared celular, en contraste, cuando el pH aumentó la superficie de la célula se cargó negativamente y el proceso de retención se vio favorecido, de acuerdo a los registros del Cuadro 20 se observó un descenso del pH inicial respecto al pH final y acuerdo a la ecuación de relación de la Figura 20 se observa que la concentración influye en la disminución del pH por lo cual existe una variación de pH inversamente proporcional a las concentraciones de iones de Pb (II) lo cual explica la ineficiencia de bioacumulación de iones de Pb (II) en las soluciones con mayores concentraciones de plomo pues el tener valores de pH menores que las demás concentraciones contribuye a la disminución de eficiencia de bioacumulación, como lo indica Romera *et al.* (2006), citados por YAQUB *et al.*

(2012) quienes sostienen que el aumento de la capacidad de biosorción es atribuido al aumento del pH pues las superficies de las células se cargan de manera negativa y el proceso de retención se ve favorecido; por tanto el pH de la solución desempeña un papel importante en el proceso de absorción, además como indica CASTILLO y ROLDAN (2005), la influencia del pH se debe al efecto sobre la solubilidad del metal, la estructura del absorbente y el estado del grupo que liga el metal.

Finalmente en cuanto a los valores de temperatura registrados en el Cuadro 19 y presentados en la Figura 19, se aprecia el aumento de temperatura en los medios de tratamiento al finalizar los experimentos y de acuerdo a la ecuación de las curvas de la Figura 19 las concentraciones de plomo en el medio influyen en la disminución de la temperatura a medida que éstas aumentan, a su vez la temperatura influyó en la bioacumulación de plomo en *Spyrogira sp.* pues aumentó la velocidad de difusión de las moléculas de plomo a través de las capas externas de la pared celular del alga incrementando así la reacción de absorción de plomo, además CASTILLO y ROLDAN (2005), indican que la eficiencia de bioacumulación es máxima entre 5 y 40 °C, rango de temperatura en el que se dieron los tratamientos, las temperaturas registradas en ésta investigación oscilaron entre 23.55 y 25.78°C.

VI. CONCLUSIÓN

Se logró identificar microscópicamente el alga de género *Spirogyra sp*, mucosas al tacto; antes de la exposición a las concentraciones de plomo mostraron tres cloroplastos parietales acintados con numerosos pirinoides, después de la exposición se observó la degradación del pigmento fotosintético y los organelos celulares mostraron cambios morfológicos anormales debido a la toxicidad del plomo.

El análisis espectrofotométrico realizado al material biológico experimental antes de su exposición a las diferentes concentraciones de plomo (50, 100, 150, 200, 250 ppm) evidenció la ausencia de dicho metal pesado, mientras que después de haber sido expuestas se determinó la presencia de iones de plomo acumulados en el género *Spyrogira sp.*; concentraciones que oscilan entre 8.80 y 160.40 mg de plomo, acumulación que fue progresiva conforme aumentó la concentración en el medio.

Al culminar el tiempo de contacto de veinticuatro horas entre la biomasa experimental y las diferentes concentraciones de plomo, se determinó las concentraciones finales de los medios acuosos residuales mediante el análisis espectrofotométrico, registrándose valores que oscilan entre 3.10 mg y

35.40 mg de plomo residual lo cual significa que el alga al saturarse del metal dejó de acumular éstas cantidades residuales.

El aumento de las concentraciones de plomo en el medio influyó en la disminución progresiva del pH y la temperatura, además estos dos factores físicos influyeron en la eficiencia de bioacumulación pues cuando el pH y la temperatura aumentaron, el proceso de acumulación del metal en las células del alga se vio favorecido.

La evaluación del proceso de bioacumulación de iones de Pb (II) usando *Spyrogira sp.* permitió determinar la eficiencia de bioacumulación de Pb(II) por el alga a escala de laboratorio, donde la máxima eficiencia alcanzada fue de 94.38 % que se obtuvo a pH de 6.86, a temperatura de 24.90 °C, a un tiempo de contacto de 12 horas y a una concentración de 99.10 mg, siendo 105 mg (150ppm) la dosis inicial aplicada para lograr ésta acumulación; pudiéndose afirmar que el género *Spirogyra sp.* puede ser empleado como acumulador de plomo en el tratamiento de aguas residuales de lixiviados mineros.

VII. RECOMENDACIONES

Implementar de equipos modernos a los laboratorios del Departamento de Ciencias Ambientales, de esta manera no se limitará el proceso de investigación para los tesisistas y se podrá innovar temas de investigación

Realizar estudios de investigación respecto a factores externos como temperatura, pH, luz, salinidad que puedan influir sobre la respuesta de eficiencia de bioacumulación en *Spyrogira sp.*

Evaluar la eficiencia de bioacumulación de otros metales pesados utilizando muestras de aguas de lixiviados mineros o de efluentes industriales.

Para el manejo de un sistema de tratamiento de aguas residuales de lixiviados mineros con algas de este género, el diseño deberá tener en cuenta el tiempo de vida del alga así como el nivel de concentración promedio de plomo con el que se vaya a tratar, en caso que la concentración de plomo estuviera a concentraciones menores a 150 mg/l se podrán obtener mejores porcentajes de eficiencia de acumulación a un tiempo de contacto de 12 horas.

ABSTRACT

This study evaluated the efficiency of lead bioaccumulation by the alga *Spyrogira sp.* in laboratory scale at the Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS). Alga specimens were exposed to different concentrations of 50, 100, 150 and 250 mg/l of lead in a period of 24 hours. Final metal concentrations were determined by atomic absorption spectrophotometry. The highest metal accumulation rates were found at an initial concentration of 150 mg/l, lead accumulation in the alga showed a linear pattern that was increased with exposure to concentration and time. The results allow concluding that alga from genus *Spyrogira sp.* have efficient lead accumulation capacity, which is found as a function of the initial metal concentration in the environment and de exposure time, registering its highest capacity of accumulation and efficiency at a concentration of 99.10 mg and 12 hours of contact time, being 150 ppm (105 mg) the initial dose used, with 94,85% of bioaccumulation efficiency. Therefore, is possible to state that the genus *Spyrogyra sp.* could be used as an accumulator for sewage treatment.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOUBORDE, L. 2008. Remoción de metales pesados por medio de adsorbentes no convencionales. Tesis Msc. Recursos naturales. Temuco, Chile. Universidad de la Frontera. 155 p.
- AHLUWALIA, S., GOYAL, D. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology* 98 (12): 2243-2257.
- CASTILLO, F., ROLDAN, M. 2005. *Biotecnología Ambiental*. Editorial Tébar S.L. Madrid, España. 616 p.
- CONKLIN, L., SANCHEZ, C. NERI, A. 2008. Exposiciones a metales pesados en niños y mujeres en edad fértil en tres comunidades mineras de Cerro de Pasco, Perú. Centro Nacional para la Salud Ambiental. Pasco. Perú. 75 p.
- DIAZ, R. HUNTER, A. 1982. Metodología de muestreo de suelos, análisis químico de suelos y tejido vegetal y de investigaciones en invernadero. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 65 p.
- DOMENECH, X. 1995. *Química del suelo: el impacto de los contaminantes*. Niguarano S.A. Madrid, España. 190 p.
- FERNANDEZ, A., YARTO, M., CASTRO, J. 2004. *Las sustancias toxicas persistentes*. Instituto Nacional de Ecología. México D.F, México. 260 p.

- GARZA, M. 2005. Aislamiento de microorganismos con alta capacidad de tolerar y remover Pb (II), Cr (VI), Cd (II), Cu (II), Zn (II) y Ni (II). Tesis. Dr. Ciencias Biológicas. La Habana, Cuba. Universidad de la Habana. 143 p.
- GUPTA, V., RASTOGI, A. 2008. Biosorption of lead from aqueous solutions by green algae *Spyrogira* species: Kinetics and equilibrium studies. *Journal of Hazardous materials*. 152(1): 407-414.
- INE. 2001. Lo que usted debe saber sobre el plomo. [En línea]: (<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/folletos/98/98.html>, folletos, 28 Abr. 2013).
- International Programme on Chemical Safety (IPCS). 1994. INTOX Databank. Lead,organic. International Programme on Chemical Safety. [En línea]: (<http://www.intox.org/databank/documents/chemical/leadorgn/organlea.html>, documentos, 23 Dic. 2013).
- MANAHAN, E. 2007. Introducción a la Química Ambiental. Editorial Reverté S.A. México D.F., México. 149 p.
- MANE, P., BHOSLE, A. 2012. Bioremoval of Some Metals by Living Algae *Spyrogira sp.* and *Spirullina sp.* from aqueous solution. *International Journal of Environmental Research*. 6(2): 571-576.
- MMARP (Manual para el Manejo Ambiental Responsable del Plomo). 2006. [En línea]: Cámara Minera de México: (<http://www.ilmc.org/spanish/Manual%20para%20el%20Manejo%20Ambientalmente%20Responsable%20del%20Plomo.pdf>, documentos, 28 abr. 2013).

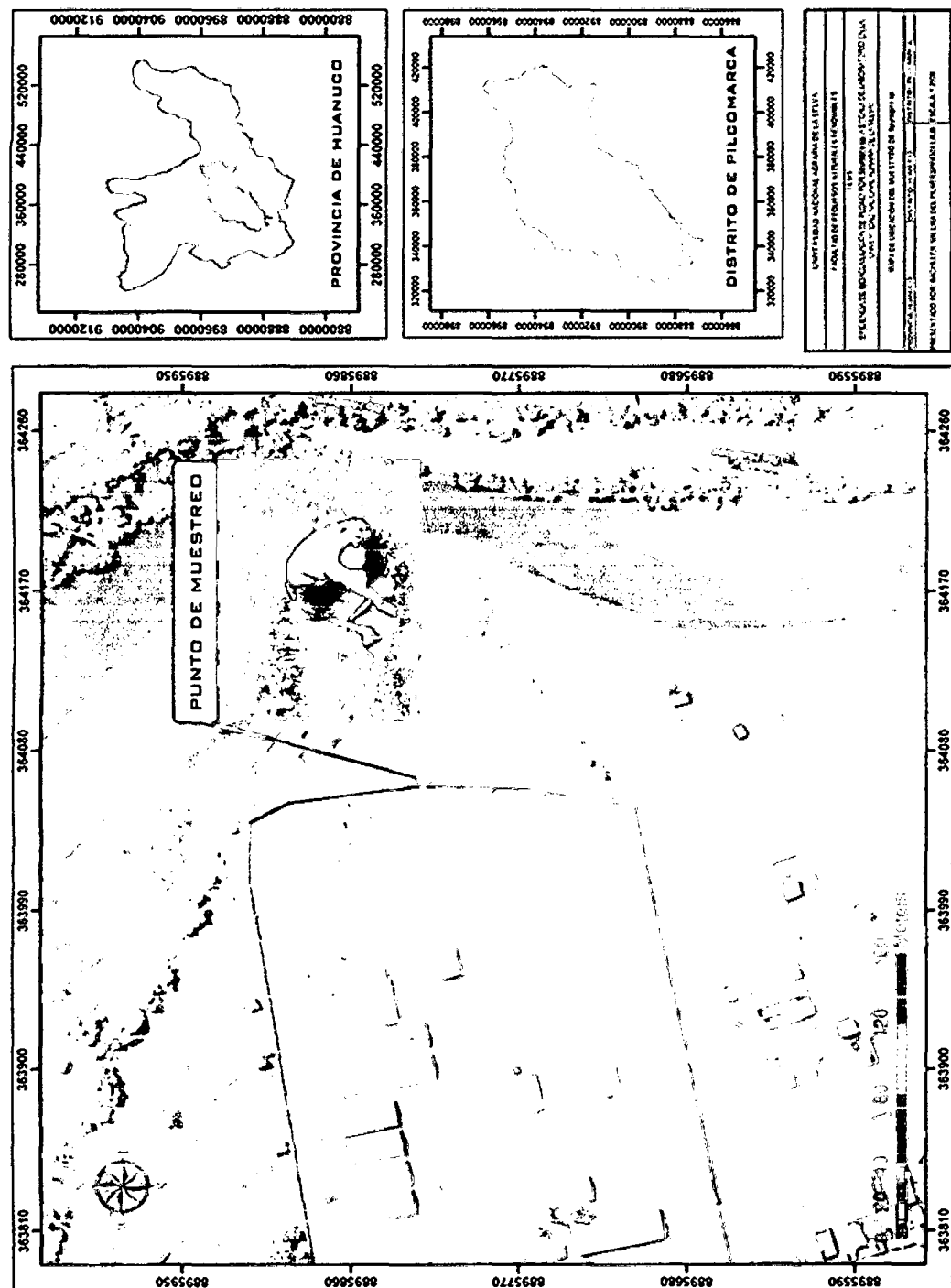
- MODHER, H. SALLEH, A., MILOW, P. 2009. Characterization of the Adsorption of the Lead (II) by the Nonliving Biomass *Spyrogira neglecta* (Hassal) Kutzing. Institute of Biological Sciences. 5(2): 75-83.
- MONTORO, M, 2009. Agua, El: Estudios Interdisciplinarios. Editorial Ateleir. Barcelona, España. 327 p.
- MURRAY, J. 2002. GCSE Biology. 3 ed. Editorial D.G. Mackean. London, UK. 197 p.
- NAVARRO, J; AGUILAR, I; LÓPEZ, J. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. Ecosistemas.16 (2).10-25.
- OSPINA, N., PEÑA, E., BENITEZ, R. 2006. Efecto de la salinidad en la capacidad de bioacumulación de plomo en el alga verde *Rhizoclonium riparium* (Roth) Harvey (Chlorophyceae, Cladophorales). Acta biol.Colomb. 28 (84): 17-25.
- PEÑA, E., PALACIOS, M., OSPINA, N. 2005. Algas indicadoras de contaminación. Imprenta Departamental. 164 p.
- PLAZA, J. 2012. Remoción de metales pesados empleando algas marinas. Tesis Ing. Química. La Plata, Argentina. Universidad Nacional de la Plata. 140 p.
- RABANAL, M. 2006. Estudio de la biosorción de Co (II) por el alga marina *Macrosystis pyrifera*. Tesis Ing. Química. Lima, Perú. Universidad Nacional de San Marcos. 85 p.

- RAMOS, G. GUEVARA, H., SUCARI, M. 2009. Informe de contaminación de niños con plomo en sangre. Comisión de salud, población, familia y personas con discapacidad. Lima, Perú. 36 p.
- SALINAS, J., GARCIA, R. 1985. Métodos químicos para el análisis de suelos ácidos y plantas forrajeras. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 83 p.
- SICCHA, A. 2012. Eficacia de la biosorción de Plomo mediante cochayuyo pre-tratado (*Chondracanthus chamissoi*). Tesis Ing. Química. Callao, Perú. Universidad Nacional del Callao. 43 p.
- STELL, R., TORRIE, J. 1989. Précis de Botanique – I; Végétaux Inférieurs. Trad. Por Julio Bueno. 2 ed. Paris, Francia, Masson Editeur. 713 p.
- TENORIO, G. 2006. Caracterización de la biosorción de cromo con hueso de aceituna. Tesis Ing. Químico. Granada, España. Universidad de Granada. 263 p.
- YAQUB, A., ADNAN, A., KHAN, W., ANJUM, K. 2012. Biosorption of hexavalent chromium by *Spyrogira sp.*: equilibrium, kinetics and thermodynamics. The Journal of Animal & Plant Sciences. 22(2): 408-415.

IX. ANEXOS

Apéndice 1. Metodología

a. Ubicación del lugar de muestreo



b. Determinación de las concentraciones

Una vez determinada las concentraciones en ppm se realizaron los siguientes cálculos. Ejemplo para una lectura cuyo resultado fue de 1.05 ppm:

$$FD = \frac{10}{0.1} = 100$$

1°. Se multiplicó por el factor de dilución.

$$1.05 \text{ ppm} \times 100 = 105 \text{ ppm}$$

2° Cálculo de mg de Pb en 0.5 g de alga

$$\begin{array}{r} 105 \text{ mg} \text{ ----- } 1000 \text{ ml} \\ x \text{ ----- } 100 \text{ ml} \end{array}$$

$$x = \frac{105 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 10.5 \text{ mg}$$

3° Cálculo de mg de Pb en la solución de 50 ppm

$$\begin{array}{r} 50 \text{ mg} \text{ ----- } 1000 \text{ ml} \\ x \text{ ----- } 700 \text{ ml} \end{array}$$

$$x = \frac{50 \text{ mg} \times 700 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}}$$

$$x = 35 \text{ mg}$$

Entonces 0.5 g de alga seca bioacumuló 10.5 mg de Pb y el 24.5 mg restante quedó en la solución final.

4° Cálculo de la eficiencia

$$E = \left(\frac{\text{mg Pb en la sol. de tratamiento inicial} - \text{mg Pb en la sol. de tratamiento final}}{\text{mg Pb en la sol. de tratamiento inicial}} \right) \times 100\%$$

$$E = \left(\frac{35 \text{ mg} - 24.5 \text{ mg}}{35 \text{ mg}} \right) \times 100\%$$

$$E = 30 \%$$

Apéndice 2. Cuadros

Cuadro 21. Descripción de los tratamientos en estudio.

Tratamiento	Tiempo (hora)	Concentración de Pb		Cantidad de biomasa (mg)	Repeticiones
		ppm	mg		
T1	1	50	35	7000	3
T2	2	50	35	7000	3
T3	6	50	35	7000	3
T4	12	50	35	7000	3
T5	24	50	35	7000	3
T6	1	100	70	7000	3
T7	2	100	70	7000	3
T8	6	100	70	7000	3
T9	12	100	70	7000	3
T10	24	100	70	7000	3
T11	1	150	105	7000	3
T12	2	150	105	7000	3
T13	6	150	105	7000	3
T14	12	150	105	7000	3
T15	24	150	105	7000	3
T16	1	200	140	7000	3
T17	2	200	140	7000	3
T18	6	200	140	7000	3
T19	12	200	140	7000	3
T20	24	200	140	7000	3
T21	1	250	175	7000	3
T22	2	250	175	7000	3
T23	6	250	175	7000	3
T24	12	250	175	7000	3
T25	24	250	175	7000	3

Apéndice 3. Galería de fotos



Figura 22. Recolección de algas.



Figura 23. Muestras de *Spyrogira* sp.



Figura 24. Preparación del caldo de macro y micronutrientes.

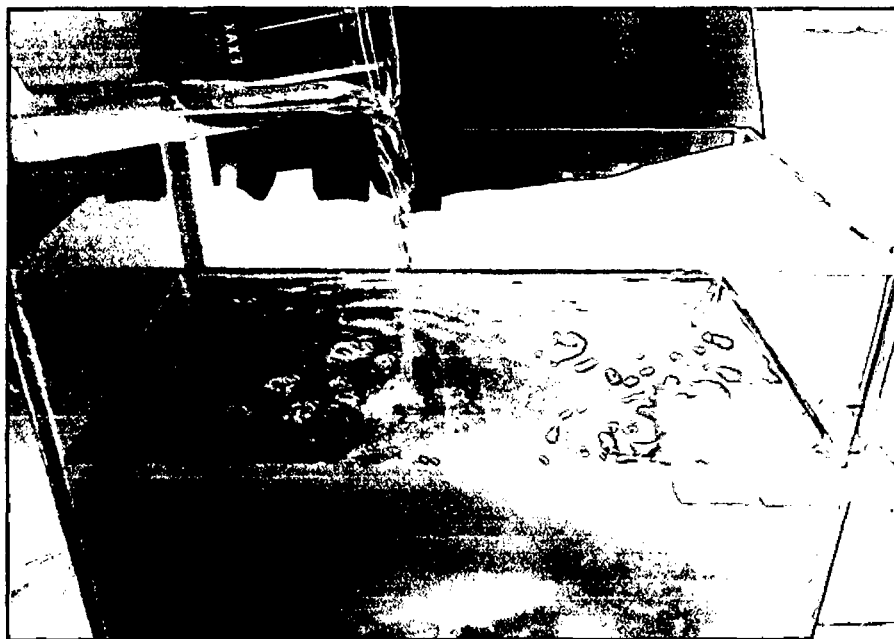


Figura 25. Preservación de las *Spyrogira* sp. en el laboratorio.

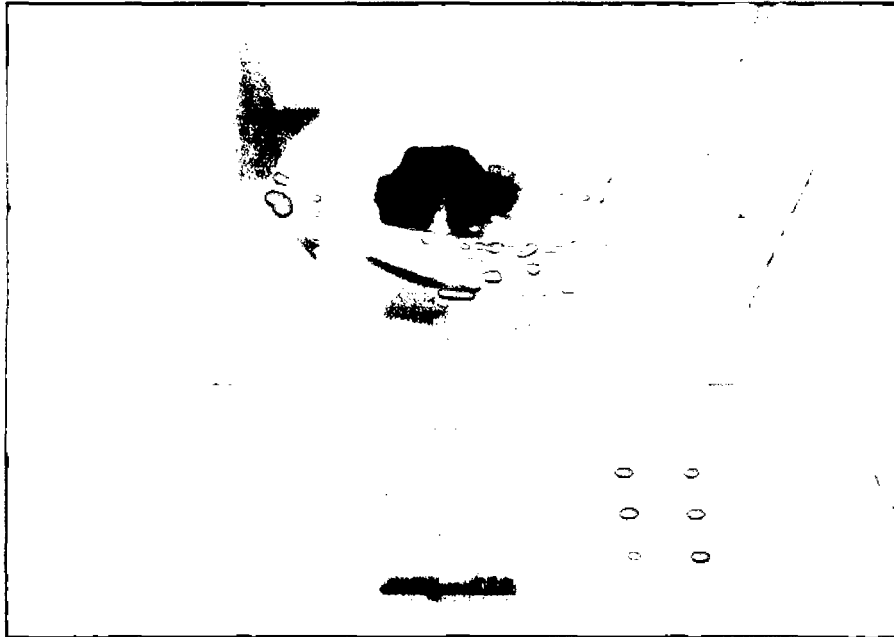


Figura 26. Pesado de las muestras de *Spyrogira sp.* para realizar los bioensayos.

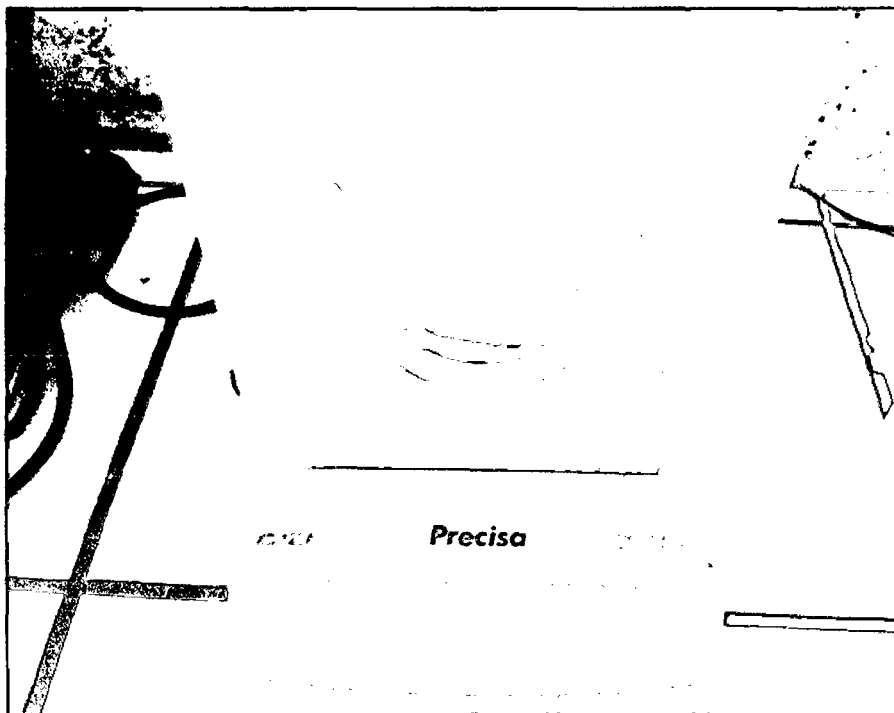


Figura 27. Pesado del acetato de plomo a utilizar para preparar las concentraciones de los bioensayos.



Figura 28. Soluciones de diferentes concentraciones de acetato de plomo listas para iniciar los bioensayos.



Figura 29. Preparación de las concentraciones mediante dilución de solución estándar.

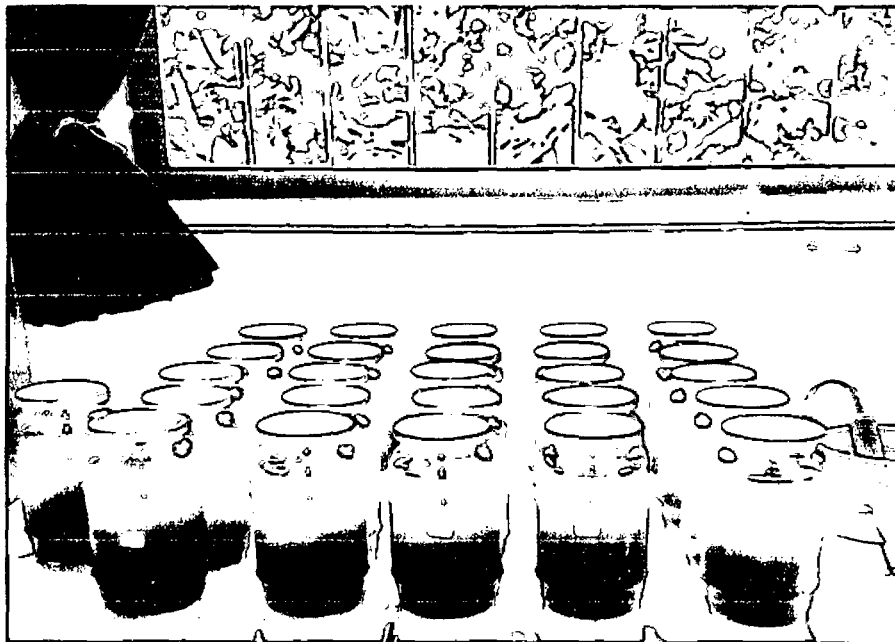


Figura 30. Muestras listas para realizar la evaluación de los bioensayos.

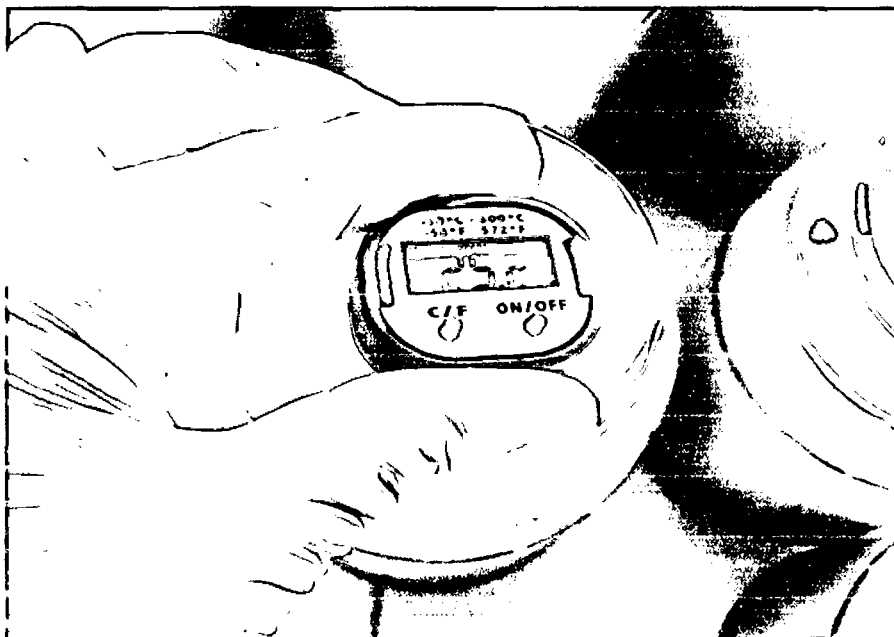


Figura 31. Registro de temperaturas iniciales de las muestras..



Figura 32. Registro de temperaturas finales de las muestras.



Figura 33. Registro del pH de las muestras.



Figura 34. Secado de las muestras en estudio.

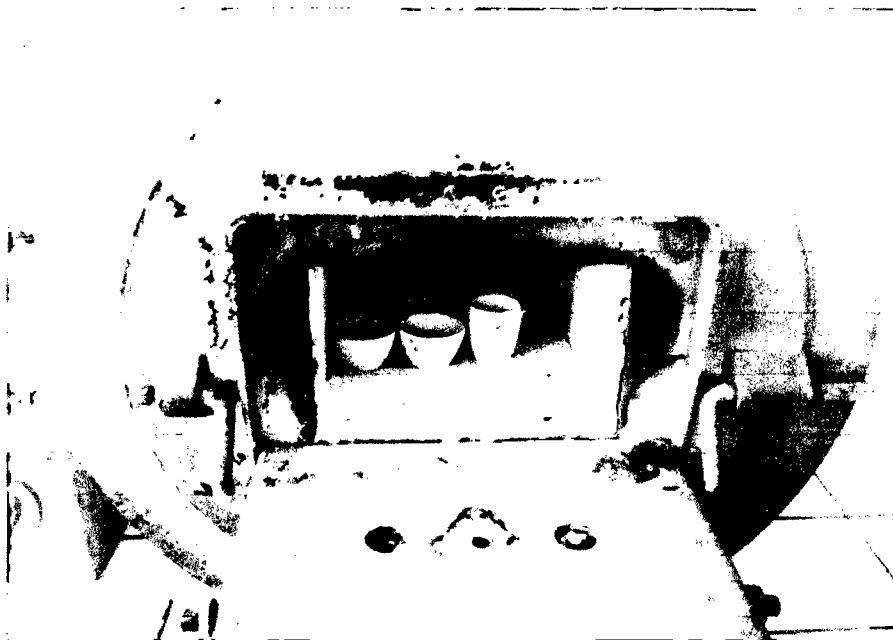


Figura 35. Calcinación de las muestras en la mufla.



Figura 36. Pesado de las muestras calcinadas.

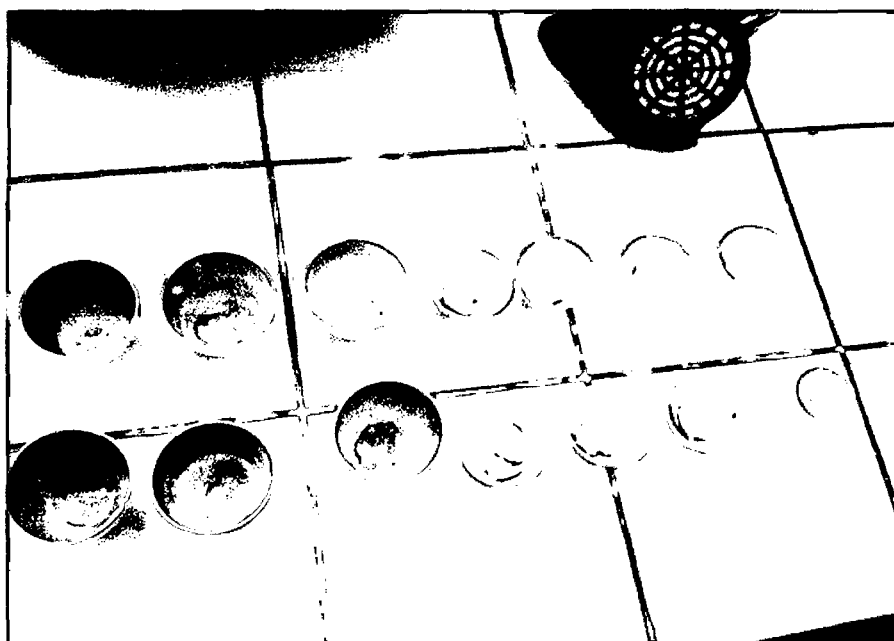


Figura 37. Muestras en forma de ceniza listas para preparar los extractos.



Figura 38. Preparación de los extractos de las muestras.



Figura 39. Adición de 2 mL de ácido clorhídrico.



Figura 40. Digestión de las muestras en una plancha caliente



Figura 41. Muestras listas para el proceso de filtrado.

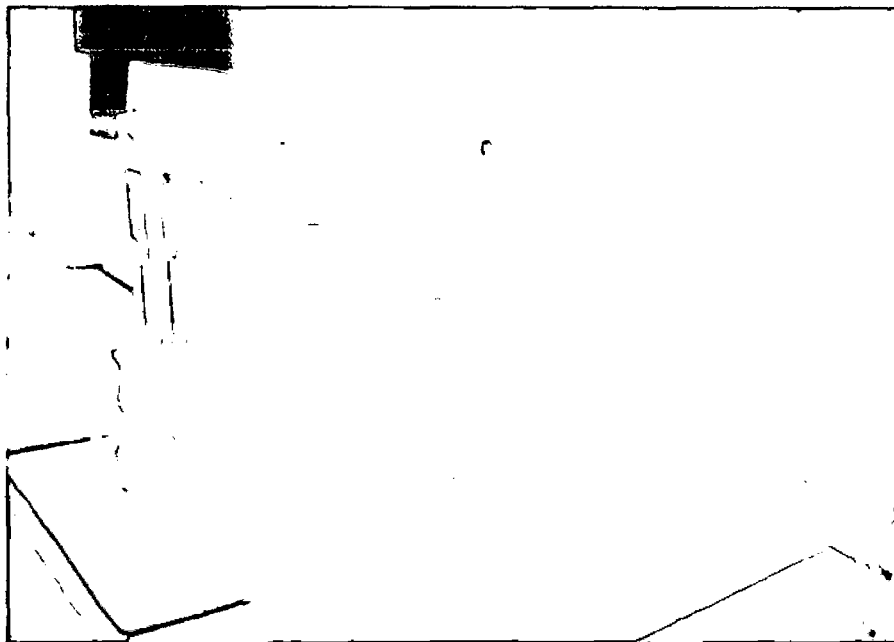


Figura 42. Muestras listas en los tubos de ensayo para determinación de plomo.



Figura 43. Muestras listas para realizar la determinación de plomo en el espectrofotómetro de absorción atómica

GLOSARIO

Adsorción: adherencia de las moléculas en la superficie de contacto.

Analito: sustancia contenida en la muestra sometida a análisis.

Amida: es un compuesto orgánico que consiste en una amina unida a un grupo acilo convirtiéndose en una amina ácida (o amida). Por esto su grupo funcional es del tipo RCONH", siendo CO un carbonilo.

Aminoácido: es una molécula que contiene un grupo carboxilo (-COO) y un grupo amino (-NH₃) libres.

Bioensayo: cuantificación del efecto de un factor determinado sobre un organismo; el factor puede ser, por ejemplo, una sustancia tóxica

Bioacumulación: acumulación de determinadas sustancias químicas en tejidos de organismos vivos de manera directa o a través de la cadena alimenticia, alcanzando concentraciones mayores que en el ambiente al que está expuesto.

Biomagnificación: aumento en la bioacumulación de una sustancia a lo largo de la cadena trófica.

Biomasa: materia orgánica producida por las plantas y otros productores fotosintéticos.

Biosorción: describe la eliminación de metales pesados por la unión pasiva a biomasa no viva a partir de soluciones acuosas; el mecanismo de remoción no está controlado por el metabolismo.

Concentración: proporción de contaminante presente en un medio generalmente expresado en unidades de masa como micro o nanogramos fraccionando a una unidad de masa mayor como gramos o kilos.

Dioico: talo de la especie en la que los sexos están separados en diferentes individuos.

Efluente: descarga directa de aguas residuales que son descargadas al ambiente, cuya concentración de sustancias contaminantes es medida a través de los Límites Máximos Permisibles (LMP).

Fitoquelatinas: péptidos sintetizados enzimáticamente que juegan un papel importante en homeostasis y destoxificación de metales pesados. Derivan del glutatión y se polimerizan para formar péptidos secuestradores de metales pesados en muchas especies de plantas y microorganismos.

Nucléolo: es una región del núcleo que se considera una estructura supra macromolecular, que no posee membrana que lo limite. La función principal del nucléolo es la transcripción del ARN ribosomal.

Organelos: son estructuras suspendidas en el citoplasma de la célula eucariota, que tienen forma y funciones especializadas bien definidas, diferenciadas y que presentan su propia envoltura de membrana lipídica.

Algunas de ellas son: las mitocondrias, las vacuolas, el retículo endoplasmático (liso y rugoso), aparato de golgi, ribosomas, etc.

Pirenoide: organelo asociado a los cloroplastos. Su función está relacionado con la síntesis de las sustancias de reserva, mostrando usualmente en algas verdes varias placas de almidón asociadas.

Recalcitrancia: condición de un compuesto xenobióticos, especialmente resistente a degradación físico- química o biológica.

Solución: sistema homogéneo que resulta de mezclar un sólido con un líquido o gas con un líquido.

Soluto: sustancia que se encuentra disuelta en una solución.

Solvente: líquido en que se disuelve el soluto.

Tanoides: son sustancias de origen vegetal, no nitrogenadas, de estructura polifenólica, solubles en agua , alcohol ; acetona.

Toxicidad: capacidad para causar daño a un organismo vivo así como respecto de cualquier efecto adverso de una sustancia química en un organismo vivo

Vacuola: estructura celular constituida por una membrana y un contenido interno. Las células vegetales suelen presentar una única vacuola de gran tamaño a diferencia de las animales que presentan varias vacuolas cuya función es almacenar sustancias de reserva y en ciertos casos, de almacenamiento de sustancias tóxicas.