

**BIORREMEDIACIÓN DE MANGANESO Y DE SÓLIDOS SUSPENDIDOS
TOTALES, POR *Lemna minor* y *Chlorella sp* EN MUESTRAS DE UN
EFLUENTE DE UNA CENTRAL TERMOELÉCTRICA**

JAVIER MAURICIO VILLAMIZAR CÚJAR



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO-QUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL
BUCARAMANGA**

2013

**BIORREMEDIACIÓN DE MANGANESO Y DE SÓLIDOS SUSPENDIDOS
TOTALES, POR *Lemna minor* y *Chlorella sp* EN MUESTRAS DE UN
EFLUENTE DE UNA CENTRAL TERMOELÉCTRICA**

JAVIER MAURICIO VILLAMIZAR CÚJAR

Trabajo de aplicación, presentado como requisito para optar al título de:

Magíster en Ingeniería Ambiental

Director

Ph. D. VIATCHESLAV KAFAROV

Codirector

M.Sc. LUZ YOLANDA VARGAS FIALLO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO-QUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL
BUCARAMANGA**

2013

DEDICATORIAS

A Tatiana y a mi familia con todo mi amor.

Javier Mauricio Villamizar Cújar

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco al ingeniero Mario Chacón y a la empresa Administramos y Transportamos A.T S.A.S, por su apoyo incondicional, por creer en la investigación y financiar la realización de mi trabajo investigativo.

Al ingeniero eléctrico Eduardo Fabre, por su apoyo en el establecimiento técnico del laboratorio y las adecuaciones.

Al Msc Iván Darío Camargo, por la asesoría en estadística y por su amistad.

Al Biólogo, Andrés Fernando Barajas, por su colaboración.

A mi familia por su cariño, amor y por apoyarme cada día de mi vida, por la confianza que siempre me han tenido.

A Tatjana Aristizabal, por su ayuda en los cálculos matemáticos, por acompañarme, apoyarme, darme ánimo en los momentos difíciles, por animarme y reconfortarme cuando lo necesité, por ayudarme con ideas y buena energía, por estar allí siempre, por ser mi mejor amiga y el amor de mi vida.

A cada una de las personas que colaboraron con la realización del proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. OBJETIVOS	18
1.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
2. MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1 FUENTE DE AGUAS RESIDUALES.....	19
2.2 ORGANISMOS Y MEDIO DE CULTIVO.....	20
2.3 FOTOBIORREACTORES.....	20
2.4 SISTEMA DE ILUMINACIÓN.....	21
2.5 SISTEMA DE AIREACIÓN.....	21
2.6 SISTEMA DE MONITOREO DE TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA.....	22
2.7 PARAMETROS DE CRECIMIENTO.....	22
2.7.1 Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos.....	22
2.7.2 Medida de crecimiento de los organismos.....	23

2.8 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.....	24
2.9 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DEL METAL BIORREMOVIDO, BIOABSORBIDO Y BIOADSORBIDO.....	26
2.10 PORCENTAJE DE BIORREMOCIÓN EN EL AGUA.....	28
2.11 PORCENTAJE DE BIOABSORCIÓN.....	28
2.12 PORCENTAJE DE BIOADSORCIÓN.....	28
2.13 LA CINÉTICA DE ELIMINACIÓN DE Mn^{2+} EN LA COLUMNA DE AGUA.....	29
2.14 CINÉTICA DE ADSORCIÓN.....	30
2.15 CINÉTICA DE ACUMULACIÓN INTRACELULAR.....	32
2.16 TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	32
2.17 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
3. RESULTADOS.....	36
3.1 EFICIENCIAS DE BIORREMOCIÓN (BIOABSORCIÓN, BIOADSORCIÓN Y BIORREMOCIÓN) DEL METAL PESADO.....	36
3.2 FACTORES DE ADSORCIÓN (FAD), DE ACUMULACIÓN INTRACELULAR (FAI) Y DE BIOCONCENTRACIÓN (FBC).....	41
3.3 CINÉTICA EN LA BIORREMEDIACIÓN DEL Mn^{2+}	41
3.4 CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE LOS SST.....	42
3.5 EFECTO DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN.....	48
3.6 PRODUCTIVIDAD DE LA BIOMASA.....	49
3.7 PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS.....	52
3.8 VARIACIÓN DE PH Y PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS.....	52
4. DISCUSIÓN.....	56
4.1 CINÉTICA DE ELIMINACIÓN, ADSORCIÓN, DE ACUMULACIÓN INTRACELULAR Y EFICIENCIA EN LA BIORREMOCIÓN DEL MANGANESO...	56

4.2 FACTOR DE ACUMULACIÓN INTRACELULAR (FAI), FACTOR DE ADSORCIÓN (FAD) Y FACTOR DE BIOCONCENTRACIÓN (FBC), POR PARTE DE <i>L. minor</i> Y <i>Chlorella sp.</i>	60
4.3 EFECTO DEL TAMAÑO DEL BIOABSORBENTE Y DE LA DENSIDAD CELULAR.....	65
4.4 APROXIMACIÓN AL MECANISMO DE BIORREMOCIÓN.....	68
4.5 MANGANESO Y SU EFECTO EN LOS PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS Y CRECIMIENTO DE <i>L. minor</i> Y <i>Chlorella sp.</i>	71
4.6 REMOCIÓN DE LOS SST Y RELACIÓN CON LA PRODUCTIVIDAD DE LA BIOMASA.....	73
4.7 EFECTO DEL PH Y LA TEMPERATURA EN LA BIORREMOCIÓN DEL MN^{2+} Y DE LOS SST.....	75
4.8 REVISIÓN LITERARIA DE OPCIONES TECNOLÓGICAS PARA EL MANEJO DE LA BIOMASA RESIDUAL.....	76
5. CONCLUSIONES.....	81
6. RECOMENDACIONES.....	84
BIBLIOGRAFÍA.....	86

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Representación del esquema de biorremediación desarrollado en la investigación, empleando la macrófita, <i>L. minor</i> y la microalga, <i>Chlorella sp.</i>	34
Figura 2. Eficiencias de biorremoción, FAI, FAD y FBC, en diferentes tiempos de exposición de <i>L. minor</i> al manganeso.....	43
Figura 3. Eficiencias de biorremoción del Mn^{2+} , por <i>L. minor</i> y <i>Chlorella sp.</i> , frente al control sin inóculo.....	44
Figura 4. Eficiencias de biorremoción, FAI, FAD y FBC, en diferentes tiempos de exposición de <i>Chlorella sp.</i> al manganeso.....	45
Figura 5. Correlaciones lineales mediante prueba de Pearson.....	46
Figura 6. Biorremoción de sólidos suspendidos totales (SST), por parte de <i>L. minor</i> y <i>Chlorella sp.</i>	47
Figura 7. Relación entre la remoción de sólidos suspendidos volátiles (SSV) y sólidos suspendidos totales (SST), por parte de <i>Chlorella sp.</i>	48
Figura 8. Tasa de crecimiento relativa (RGR), y parámetros de crecimiento evaluados en <i>L. minor</i> y <i>Chlorella sp.</i>	50
Figura 9. Curva de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> , a partir de la densidad celular...51	51
Figura 10. Pigmentos fotosintéticos en <i>L. minor</i>	53
Figura 11. Pigmentos fotosintéticos en <i>Chlorella sp.</i>	54

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Caracterización del agua residual a tratar.....	20
Tabla 2. Descripción de los parámetros evaluados durante los experimentos del proyecto.....	25
Tabla 3. ANOVA de dos vías, para la evaluación de la capacidad de biorremoción de Mn ²⁺ y SST, por <i>L. minor</i> y <i>Chlorella sp.</i>	37-38
Tabla 4. Eficiencia de biorremoción del Mn ²⁺ y de los SST, mediante <i>L. minor</i> y <i>Chlorella sp.</i> ; respecto a la concentración inicial del efluente (C _i), evaluada previo a los experimentos.....	39
Tabla 5. Eficiencia de biorremoción del Mn ²⁺ y de los SST, mediante <i>L. minor</i> y <i>Chlorella sp.</i> ; respecto a la concentración inicial (C _i) de entrada en cada experimento.....	40
Tabla 6. Concentraciones de Mn ²⁺ a lo largo de los 16 días de exposición para los experimentos con <i>L. minor</i> y <i>Chlorella sp.</i>	40
Tabla 7. FAI, FAD, FBC, evaluados en <i>L. minor</i> y <i>Chlorella sp.</i>	41
Tabla 8. Cinética de eliminación y de acumulación intracelular en <i>L. minor</i> y <i>Chlorella sp.</i>	47
Tabla 9. Calidad promedio del medio de los diferentes parámetros analizados en el sistema de tratamiento desarrollado.....	55

RESUMEN

TITULO:

BIORREMEDIACIÓN DE MANGANESO Y DE SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES, POR *Lemna minor* y *Chlorella sp* EN MUESTRAS DE UN EFLUENTE DE UNA CENTRAL TERMOELÉCTRICA.*

AUTOR:

Javier Mauricio Villamizar Cújar**

Palabras claves:

Lemna minor, *Chlorella sp*, metal pesado, bioabsorción, bioadsorción, biorremoción, agua residual.

DESCRIPCIÓN

El manganeso (Mn^{2+}) es un metal pesado, considerado un micronutriente, para muchos organismos. A pesar de ello, con altas concentraciones, o a partir del proceso de biomagnificación en la cadena trófica, puede convertirse en un potencial tóxico. Dicho metal hace parte de las descargas de las centrales térmicas, y de otras industrias. El propósito de nuestro estudio fue evaluar la capacidad de remoción de Mn^{2+} y de sólidos suspendidos totales (SST), por parte de *Lemna minor* y *Chlorella sp*, a partir de agua residual procedente de una central térmica. Se estableció un sistema de biorremoción, de dos ciclos consecutivos de remoción, iniciando con *L. minor*, y continuado con *Chlorella sp*, cada uno durante 16 días de exposición al agua residual. Se evaluó la eficiencia de bioabsorción, bioadsorción y biorremoción del Mn^{2+} ; en combinación con la cuantificación de los factores de acumulación intracelular (FAI), de adsorción (FAD) y de bioconcentración (FBC). Valores en estos índices ≥ 1000 , se correlacionan a un organismo hiperacumulador. Se estudió la cinética de eliminación, adsorción y de acumulación intracelular. *L. minor* removió un 80,40% de los SST. *L. minor*, presentó valores > 1000 en el FAI, FAD y FBC, probando ser un organismo tolerante e hiperacumulador de Mn^{2+} , utilizando como principal mecanismo la adsorción. *Chlorella sp*, presentó valores < 1000 , en los índices, pero fue igualmente un organismo eficiente en la biorremoción del Mn^{2+} , su principal mecanismo de remoción fue la absorción. En conjunto, dichos organismos removieron un 74,20% (Mn^{2+}) en agua residual y 77,38% (Mn^{2+}) en agua residual esterilizada. *L. minor*, puede ser empleado en procesos de fitorremediación de Mn^{2+} y de SST, ya que mostró ser un organismo tolerante e hiperacumulador del Mn^{2+} , así, como un eficiente removedor de SST.

* Trabajo de Aplicación.

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Maestría en Ingeniería Ambiental. Director: Ph. D Viatcheslav Kafarov. Co-Director: M.Sc. Luz Yolanda Vargas Fiallo.

ABSTRACT

TITLE:

BIOREMEDIATION OF MANGANESE AND TOTAL SUSPENDED SOLIDS, BY *Lemna minor* AND *Chlorella sp* IN SAMPLES OF A THERMAL POWER PLANT EFFLUENT.*

AUTHORS:

Javier Mauricio Villamizar Cújar**

Key Words:

Lemna minor, *Chlorella sp*, heavy metal, bioabsorption, bioadsorption, biorremoval, wastewater.

DESCRIPTION

Manganese (Mn^{2+}) is a heavy metal, considered a micronutrient for many organisms. However, in high concentrations or because of biomagnification processes in the food chain, it can acquire a toxic potential. This metal is part of the discharges of power plants, and other industries. The purpose of our study was to evaluate the removal ability of Mn^{2+} and of total suspended solids (TSS) by *Lemna minor* and *Chlorella sp*, from a power plant's wastewater. A system of biorremoción was established with two consecutive cycles of removal, starting with *L. minor*, and continuing with *Chlorella sp*, each one for 16 days of exposure to the wastewater. The efficiency of bioabsorption, biosorption and biorremoción of Mn^{2+} was evaluated, in combination with the quantification of the intracellular accumulation factor (IAF), the adsorption and bioconcentration factor (BCF). Values for these indices ≥ 1000 , are correlated to an hyperaccumulator organism. We studied the kinetics of the elimination, adsorption and intracellular accumulation. *L. minor* removed 80.40% of the SST. *L. minor* showed values > 1000 in the IAF, BAF and BCF, proving to be an tolerant organism and a hyperaccumulator of Mn^{2+} , using as main mechanism adsorption. *Chlorella sp* showed values < 1000 , in the indexes, but it was also an efficient organism in biorremoción of Mn^{2+} ; the main removal mechanism was absorption. Together, these organisms removed 74.20% (Mn^{2+}) in wastewater, and 77.38% (Mn^{2+}) in sterilized wastewater. *L. minor*, can be used for phytoremediation of Mn^{2+} and SST, showing to be a tolerant and hyperaccumulator organism of Mn^{2+} as well as an efficient remover SST.

* Application Project.

** Physicochemical Engineering College. Chemical Engineering School. Master of Environmental Engineering. Director: Ph. D Viatcheslav Kafarov. Co-Director: M.Sc. Luz Yolanda Vargas Fiallo.

INTRODUCCIÓN

La contaminación con metales pesados y de la descarga de aguas residuales industriales y residenciales, en los ecosistemas naturales, se ha convertido en un problema serio a nivel mundial, generando un fuerte impacto en el componente biótico [29]. Como resultado, se presentan serios desórdenes en la salud humana, lo cual es producto del proceso de biomagnificación y de sus efectos tóxicos a través de la cadena trófica [5, 30].

El drenaje de la industria minera es una de las principales fuentes de vertimiento de metales pesados al ambiente [2, 94]. En la actualidad, la industria asociada al carbón libera al ambiente metales pesados emitidos a partir de las cenizas volantes y a partir de los efluentes de las centrales termoeléctricas [32, 90]. Dichas actividades contaminan principalmente los ríos, y les hace perder su potencial valor y uso como beneficio [23, 59]. El incremento en el requerimiento de energía a nivel mundial, ha posicionado al carbón, como una de las principales fuentes energéticas. Las plantas térmicas que operan con carbón pueden ser una fuente de contaminación, debido a la ceniza derivada de la quema de carbón, las cuales contienen por lo general metales pesados como el: arsénico (As), plomo (Pb), mercurio (Hg), cadmio (Cd), cromo (Cr) y selenio (Se), así como el aluminio (Al), antimonio (Sb), bario (Ba), berilio (Be), boro (B), cloro (Cl), cobalto (Co), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni), talio (Tl), vanadio (V) y zinc (Zn) [32]. Metales que pueden contaminar las fuentes hídricas, presentando un posible riesgo para el medio ambiente [60]. Además, los sedimentos y demás partículas insolubles en suspensión, pueden también reducir la actividad fotosintética en el agua y alterar el equilibrio biótico [81]. Condición que impacta negativamente los ecosistemas al introducir tóxicos químicos al medio ambiente [116]; es así, que el efecto sobre el pH del agua depende de la composición de las

cenizas, las que presentan un alto contenido de azufre producen lixiviados ácidos y las de bajo contenido, lixiviados alcalinos [41].

El manganeso es el segundo metal pesado, más abundante de la litósfera, y está presente en ecosistemas terrestres, entre 0,002% y 10% (w/w), en aguas marinas está presente en una concentración de 0,2 µg/l, y con un promedio de 8 µg/l es hallado en agua dulce [31]. Al igual que muchos otros metales, se puede encontrar en grandes concentraciones de manganeso soluble en las aguas de drenaje – efluentes de minas de metal y carbón [122]. El manganeso (Mn^{2+}), es un micronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, el cual interviene en diversos procesos metabólicos, siendo el principal la fotosíntesis y en el metabolismo enzimático [80]. El Mn^{2+} hace parte de la estructura de las proteínas fotosintéticas y de enzimas, actuando también como cofactor. Su déficit es nocivo al afectar los cloroplastos y su capacidad fotoquímica en la fotólisis del agua realizada en el fotosistema II (PSII), mecanismo que proporciona los electrones necesarios para la fotosíntesis [19]. Por lo tanto, dependiendo de su concentración, puede ser favorable para el crecimiento de la planta, o causar cambios fisiológicos y bioquímicos bajo concentraciones tóxicas en ecosistemas acuáticos. Así, el Mn tiene dos papeles en los procesos metabólicos en plantas: como micronutriente esencial y como un elemento tóxico cuando está en exceso [66]. El exceso de Mn^{2+} , puede causar inhibición de la fotosíntesis debido a la reducción en el contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b, y carotenoides), patrón evaluado en *Pisum sativum*, *Hordeum vulgare* [27, 101]. Se ha evaluado una reducción significativa en el contenido de clorofilas totales en las macrófitas, *Azolla caroliniana*, *Salvinia polyrhina* y *Spirodela polyrhiza*, y una reducción de los carotenoides en *A. caroliniana* y *S. polyrhiza* [73]. Por lo tanto, la alteración del contenido de los pigmentos en las plantas expuestas a metales pesados es uno de los primeros síntomas visibles. Dichos cambios se pueden usar como un indicador del daño fotosintético en el tejido vegetal, una manera de evaluar toxicidad [28]. Por lo tanto, el manganeso (Mn) es un elemento traza

esencial en los procesos fisiológicos, tanto para las plantas, como animales. Sin embargo, altas concentraciones de este metal en el medio ambiente acuático (> 5200 mg / l) pueden ser tóxicos [30]. El efecto del manganeso en la salud humana, al ser consumo a partir de alimentos contaminados, a través de su inhalación o por contacto, puede causar daños en el sistema nervioso central, siendo 0,26 ppm, el nivel permisible [61].

Asociado a procesos naturales y al vertimiento de aguas residuales domésticas e industriales, encontramos a los sólidos suspendidos totales (SST), definidos como la masa (mg) o concentración (mg l^{-1}) de materia orgánica e inorgánica, evaluada en un columna de agua, río o lago [121]. Dichos SST, se incrementan en las fuentes hídricas a partir del vertimiento de aguas residuales urbanas e industriales, lo cual conlleva a problemas ambientales. Dentro de las alteraciones físicas que pueden ocasionar los SST, se referencian, la reducción de la penetración de la luz a la película de agua, al incrementar la turbidez, los cambios de la temperatura del agua, así, como el relleno de canales y embalse en los cuales se depositan dichos sólidos [9]. El incremento de la turbidez asociada al incremento en los SST, reduce el oxígeno disuelto en el agua [104]; la reducción en la penetración de la luz solar, reduce la actividad fotosintética [97], lo cual limita la productividad primaria [86]. Haciendo parte de dichos SST, se incluyen contaminantes, tales como metales pesados y pesticidas [68], y nutrientes como el fosforo [47].

La biorremediación, puede definirse como un sistema biológico mediante el cual se degradan, transforman, eliminan o disminuyen los tóxicos, contaminantes orgánicos e inorgánicos, permitiendo descontaminar suelos y aguas contaminadas, a través de la actividad biológica natural de organismos vivos (plantas, algas, hongos, bacterias, entre otros) [26]. Técnica alternativa a las tecnologías tradicionales, que permite recuperar áreas contaminadas y tratar residuos industriales y domiciliarios, mediante el empleo de plantas y microorganismos, de manera eficiente y económica [75]. La biosorción,

mecanismo definido como la acumulación y la concentración de contaminantes, mediante el uso de materiales biológicos, como algas, bacterias, plantas entre otros, lo cual permite la recuperación y eliminación eficiente de contaminantes [51]. Mecanismo mediante el cual, mediante la adsorción de los grupos iónicos negativos que existen en la superficie celular de diversos organismos como algas y bacterias, y a los polisacáridos existentes en la cubierta exterior de la mayoría de las bacterias y algas [74].

Las microalgas, y las macrófitas, pueden secuestrar metales pesados mediante mecanismos de absorción y adsorción. Dichos mecanismos de unión de los iones metálicos por la biomasa de las algas, depende del tipo de ion, de sus cargas eléctricas, de la composición química del ion en la solución, y del tipo de organismo empleado [51]. La biosorción de iones metálicos, se ve afectada por varios factores, incluyendo las propiedades de la superficie específica del microorganismo, la concentración de biomasa, así como los parámetros físico-químicos de la solución, tales como el pH y la concentración inicial de iones metálicos [2]; el estado fisiológico del organismo, la edad celular, la disponibilidad de micronutrientes durante su desarrollo, así, como por la presencia de otros iones [2].

Las microalgas, entre ellas, miembros del género *Chlorella*, se han utilizado con éxito en el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales, ayudado a eliminar contaminantes, algunos de ellos productos químicos carcinógenos [50, 88]. Diversas especies del género *Chlorella* (*Chlorellaceae*), se han referenciado por su gran capacidad para remover diversos compuestos como fósforo, nitrógeno y diversos metales pesados, así, como residuos tóxicos de las aguas residuales [12]. Recientes trabajos han demostrado una importante eficiencia en la remoción de múltiples metales pesados, entre ellos Mn [120]. De igual manera, las macrófitas, entre ellas miembros de la familia *Lemnaceae*, han sido ampliamente estudiados por su potencial en la aplicación en la fitorremediación [83]. *Lemna*

minor (Lemnaceae), planta monocotiledónea, acuática flotante, conocida comúnmente como lenteja de agua o duckweed [70, 102]; ampliamente empleada en procesos de biorremoción, debido a su amplia distribución, alta tolerancia, y a que tiene una alta capacidad para remover y acumular diversos metales pesados [6, 82]. *L. minor* y otras macrófitas como *L. gibba*, emplean como principal mecanismo de remoción, la rizofiltración, mecanismo a través del cual, la planta en suspensión, emplea su raíz para remover sustancias tóxicas y el exceso de nutriente, mediante la absorción y adsorción de los mismos [52]. *L. minor* y *Chlorella sp*, fueron seleccionadas para utilizarse en nuestra investigación, debido a su fácil acceso, a las características reseñadas, y debido a su elevada tolerancia, y a su probada capacidad para remover nutrientes, entre ellos sólidos y metales pesados del agua.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Diseñar y evaluar un sistema de biorremoción de manganeso (Mn^{2+}) y de los sólidos suspendidos totales (SST), mediante el uso de la macrófita *Lemna minor* (*L. minor*) y de la microalga *Chlorella sp* en una muestra de un efluente de una central termoeléctrica.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar a escala de laboratorio la capacidad de biorremediación de Mn^{2+} y SST, de la biomasa de *L. minor* y *Chlorella sp*.
- Evaluar la velocidad de consumo del remoción del Mn^{2+} a partir del efluente seleccionado, en *L. minor* y *Chlorella sp*.
- Evaluar la capacidad de biorremoción de SST, biomasa de *L. minor* y *Chlorella sp*.
- Elaborar unas recomendaciones para la implementación de la tecnología desarrollada.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento fue desarrollado durante los meses de noviembre y diciembre de 2012; en instalaciones del laboratorio del invernadero de la escuela de biología, de la Universidad Industrial de Santander “UIS”. Se realizaron evaluaciones de muestras en el “laboratorio de biomasa”, de la escuela de ingeniería química; en el “laboratorio químico de consultas industriales (LQCI)” de la escuela de química, y la cuantificación del manganeso en el tiempo, fue realizada en laboratorio del “Grupo de investigación en minería, Biohidrometalurgica y ambiente (GIMBA), de la UIS.

2.1 FUENTE DE LAS AGUAS RESIDUALES

El agua residual industrial empleada en este estudio provino del canal de descarga del efluente de la central termoeléctrica “Martín del Corral” (Termozipa), localizada en el municipio de Tocancipá (73°, 57' longitud oeste y 4°, 58' latitud norte), en el departamento de Cundinamarca, Colombia; planta certificada en ISO14000. El efluente bajo estudio, contiene material residual propio del proceso de combustión del carbón (principal combustible de la central térmica), así, como del drenaje de los patios y cenizas y carbón, talleres y demás, descargados al río Bogotá, después de ser tratados en sedimentadores y trampas de grasas. Previo al establecimiento de los experimentos, el agua residual fue caracterizada (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización del agua residual a tratar. El Mn²⁺, y los SST, fueron evaluados durante 32 días. 16 días con *L. minor*, y 16 días con *Chlorella sp.*

Parámetro	Valoración	Método
DBO ₅ (mg O ₂ /L)	21,667	Respirométrico – SM 5210 D
Nitritos (mg NO ₂ ⁻ /L)	0,130	Espectrofotométrico – SM 4500 -B
Nitratos (mg NO ₃ ⁻ /L)	0,163	Espectrofotométrico – SM 4500 -B
Fósforo Total (mg P/L)	0,523	Espectrofotométrico – SM 4500 -P
Sólidos Totales (mg/L)	352,000	Gravimétrico – 2540 B
Sólidos Suspendidos Totales (mg/L)	140,000	Gravimétrico – 2540 D
Hierro Total (mg Fe/L)	0,134	Espectrofotométrico – SM 3500 - Fe
Manganeso (mg Mn/L)	1,1367	Absorción atómica – SM 3111 B
Nitrógeno Total (mg N/L)	0,370	Titrimétrico – Kjeldhal – SM 4500 N _T

2.2 ORGANISMOS Y MEDIO DE CULTIVO

Fronchas de la macrófita, *Lemna minor*, se aislaron a partir de estanques naturales y no contaminados cercanos a la ciudad de Santafé de Bogotá, Colombia. En el experimento preliminar con dicha macrófita, se inoculó una densidad de 12,5 gr de *Lemna minor*, en cada reactor (138,8 gr/m²). La microalga, *Chlorella sp.*, fue aislada a partir del efluente secundario del agua residual de la central termoeléctrica “Martín del Corral – Termozipa”. Se inoculó una densidad de 1,5x10⁻⁶ cel/ml de *Chlorella sp.*, en cada reactor. Debido a que los dos organismos se inocularían consecutivamente en el mismo medio (agua residual), se empleó el mismo medio nutritivo “Bold Basal” [91].

2.3 FOTORREACTORES

Para el cultivo de *L. minor* y *Chlorella sp*, se emplearon reactores rectangulares, tipo batch, fabricados en acrílico (60 cm largo x 15 cm ancho x 40 cm alto), con un grosor de lámina de 3 mm, con una capacidad de 36 l. Los reactores presentaron un área de superficie de 900 cm² (0,09 m²). Se utilizaron reactores por duplicado para cada tratamiento (dos) y control. Para el experimento inicial con *L. minor*, los reactores fueron aforados a un volumen de trabajo de 20,7 l; esto obtenido a partir de una columna de agua de 23 cm. En el experimento posterior con *Chlorella sp*, los reactores presentaron un volumen de trabajo de 16,2 L, volumen inferior al agua de entrada a *Lemna sp*, debido a los volúmenes de muestra retirados de los reactores para evaluar diferentes parámetros. Se seleccionó este tipo de reactores, ya que permiten aprovechar eficientemente la luz.

2.4 SISTEMA DE ILUMINACIÓN

Se estableció un sistema de iluminación artificial provista por lámparas fluorescentes Sylvania de luz blanca día (16 x 17 W Daylight Deluxe, 6.500 K), con una longitud de 60 cm y un diámetro de 2,6 cm, dispuestas por pares en paralelo a los reactores. Adicionalmente se realizó el montaje de un par de lámpara fluorescentes Sylvania de luz blanca día (2 x 59 W Daylight Deluxe, 6.500 K, con una longitud de 60 cm y un diámetro de 2,6 cm, dispuestas en el techo del laboratorio. Se estableció un control de la iluminación mediante el uso de temporizadores digitales programables ELECTRIC LINE, asegurando un fotoperiodo 12:12 (horas luz – oscuridad).

2.5 SISTEMA DE AIREACIÓN

Se ensambló a la base de cada reactor una manguera polidifusora (Aero-tube™), a la cual se acopló mediante mangueras de silicona una bomba de aire LP 100 RESUN (8.400 Lt/h); mecanismo a partir del cual se busca mejorar la oxigenación del agua, así, como la distribución de los nutrientes y evitará la sedimentación de las células. El sistema fue utilizado durante el proyecto con *Chlorella sp*, bajo un flujo de aire de 1 l min⁻¹. Durante el proyecto con *L. minor*, se permitió la liberación de 1 burbuja por segundo a lo largo de la base de los reactores. Dicho flujo fue insignificante y no pudo ser estimado.

2.6. SISTEMA DE MONITOREO DE TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA

Los experimentos se realizaron en laboratorio bajo condiciones controladas de temperatura y de iluminación. La temperatura ambiental y la humedad relativa del laboratorio, fue monitoreada cada 24 horas, mediante el uso de un termohigómetro digital (Cornwall, SH 101). La temperatura del agua (°C) se monitoreó mediante un analizador multiparámetro PCE – PHD 1.

2.7 PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

2.7.1 Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos. *L. minor*. El contenido de clorofila a, b, total y carotenos totales, se evaluó a partir de 40 mg de biomasa fresca de *L. minor*. Los pigmentos fueron extraídos del tejido vegetal con etanol (96%) y centrifugados a 10.000 rpm durante 10 minutos. El contenido de pigmentos fotosintéticos se calculó mediante espectrofotómetro de luz visible (Spectroquant® Pharo 300, Merck), midiendo las absorbancias del extracto obtenido a 470,0 nm, 648,6 nm y 664,2 nm, de acuerdo con Lichtenthaler [72].

Chlorella sp - El contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofilas a, b, totales y carotenos totales) en *Chlorella sp*, se evaluó a partir de la toma de muestras de 10 ml en tubos de ensayo, por triplicado, por reactor; muestras homogenizadas con (96%). Los pigmentos fotosintéticos se evaluaron mediante espectrofotómetro de luz visible (Spectroquant® Pharo 300, Merck), midiendo las absorbancias del extracto obtenido a 470,0 nm, 648,6 nm y 664,2 nm, de acuerdo con Lichtenthaler [72].

2.7.2 Medida de crecimiento de los organismos. *L. minor*. Se evaluó el crecimiento de *L. minor*, cada cuatro días (durante 12 días), mediante la evaluación del peso fresco, obtenido a partir de 30 frondas, muestreadas por triplicado, por reactor, y secadas entre capas de papel absorbente durante 10 minutos; posteriormente, dichas muestras se pesaron en balanza analítica (Serie 320XB, Precisa Gravimetrics AG). Se registró el peso seco, al secar las plantas (30 frondas) a una temperatura de 105°C en estufa de ventilación forzada, durante 24 horas, tiempo en el cual se logró un peso constante. La tasa de crecimiento relativa (RGR), definida como el incremento de biomasa por unidad de biomasa y tiempo, fue evaluada a partir del peso fresco, con base en la fórmula: $RGR = \ln P_2 - \ln P_1 / T_2 - T_1$; donde *RGR* es la tasa de crecimiento relativa ($\text{g}^{-1} \text{ día}^{-1}$), P_1 y P_2 son el peso fresco inicial y peso fresco final, respectivamente, y $(T_2 - T_1)$ son el periodo experimental [53, 54].

Se evaluó el área foliar (cm^2) cada cuatro días (durante 16 días), a partir del muestreo de 25 frondas, por reactor, a las cuales se les registraron imágenes mediante escáner (Canon, PIXMA MP190); imágenes que fueron procesadas por el programa ImageJ 1.45 (Image Processing and Analysis in Java) [98].

Chlorella sp – Se evaluó el crecimiento de *Chlorella sp*, cada 24 horas durante 16 días, mediante conteos del número de células, empleando un microscopio NIKON

(Eclipse E200) y un Hematocitómetro Neubauer (BOECO, Germany). La densidad celular (número de células por mililitro) se realizó según la descripción de Castillo [22]. La tasa de crecimiento (μ), comúnmente designado RGR, se calculó con base en los conteos celulares a partir de la adaptación de la fórmula propuesta por Guillard [42] y Brock [16]: $(\mu) = (\ln N_1 - \ln N_0) / t_1 - t_0$; donde N_1 es el número de células al tiempo final y N_0 es el número de células en el tiempo inicial, t_1 es el tiempo final y t_0 el tiempo inicial. Adicionalmente, para evaluar el aumento de biomasa de *Chlorella sp.*, se midió el peso seco de un volumen conocido (3 ml) de microalgas (peso específico), por triplicado, por reactor, cada 24 horas, según la técnica descrita por Sorokin [110].

2.8 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Se realizó un monitoreo diario, por triplicado, por reactor, de las variables oxígeno disuelto (OD (mg/L)), conductividad (CD (mS)), pH, salinidad (%) y temperatura del agua (T °C), a partir del uso de un analizador multiparámetro PCE – PHD 1. El pH no se ajustó en los experimentos.

Se determinaron los sólidos suspendidos totales (SST) de acuerdo con el “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (SM) [4]. Dicho monitoreo se realizó cada cuatro días y por triplicado, por reactor. El crecimiento de las microalgas puede incrementar el valor de los SST, es así, que basados en el propósito de evaluar los SST, representados como contaminantes, y no así, el componente alga, proponemos y realizaremos la evaluación de los SST, en el experimento con *Chlorella sp.*, así, como de los sólidos suspendidos volátiles (SSV). Los SSV, representan la fracción orgánica de los sólidos SST y su evaluación se puede correlacionar con la fracción que representan las microalgas en el medio [118]. De tal manera, que el cálculo de los SSV, nos permite deducir

el aporte que el crecimiento de *Chlorella sp* representa, y así, poder obtener un valor confiable, de la reducción del componente sólido que podemos considerar contaminante. Los cálculos se realizaron a partir de las siguientes fórmulas, $SST\ mg/L = (A-B) \times 1000 / volumen\ de\ muestra\ (mL)$; donde, SST: son los sólidos suspendidos totales, mg/L; A: es el peso del filtro más el residuo seco a 103°C – 105°C, mg; B: es el peso del filtro seco, mg; (2540 D); y $SSV\ mg/L = (A-C) \times 1000 / volumen\ de\ muestra\ (mL)$; donde, SSV: son los sólidos suspendidos volátiles, mg/L; A: es el peso del filtro más el residuo seco a 103°C – 105°C, mg; C: es el peso del filtro más el residuo calcinado a 550°C, mg; (SM-2540 D) (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción de los parámetros evaluados durante los experimentos del proyecto.

Organismo	Parámetro evaluado	Frecuencia	Repetición
<i>Lemna minor</i>	Peso fresco (PF, (g)) y Peso seco (PS, (g))	Cada 4 días	Triplicado
	Clorofila a, b, clorofilas totales, carotenos, (mg g ⁻¹)	Cada 4 días	Triplicado
	Área foliar (AF), (cm ²)	Cada 4 días	25 frondas
	Manganeso adsorbido, absorbido y biorremovido	Cada 4 días	Duplicado
	Sólidos suspendidos totales (SST, (mg l ⁻¹))	Cada 4 días	Triplicado
	pH, temperatura del agua (T° (°C)), conductividad (CD (mS)), oxígeno disuelto (OD (mg/l)), salinidad (SAL (%))	Diario	Triplicado
<i>Chlorella sp</i>	Peso seco (PS, (g))	Diario	Triplicado
	Clorofila a, b, clorofilas totales, carotenos, (µg/ml)	Diario	Triplicado
	Densidad celular (cel/ml)	Diario	Triplicado
	Manganeso adsorbido, absorbido, biorremovido	Cada 4 días	Duplicado
	SST (mg l ⁻¹), sólidos suspendidos volátiles (SSV (mg l ⁻¹)).	Cada 4 días	Triplicado
	pH, temperatura del agua (T° (°C)), conductividad (CD (mS)), oxígeno disuelto (OD (mg/l)), salinidad (SAL (%))	Diario	Triplicado

2.9 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DEL METAL BIORREMOVIDO, BIOABSORBIDO Y BIOADSORBIDO

Se evaluó el contenido del Mn^{2+} (mg/l), mediante método espectrofotométrico (SM-3111 B), mediante el uso de un espectrofotómetro de absorción atómica (EAA) de aspiración directa, utilizando flama de aire-acetileno buck scientific modo 210 vgp; a partir de Standard Methods [4]. Se realizó la evaluación de la remoción del Mn^{2+} a partir del procedimiento modificado a partir del trabajo de Olgúin et al. [95].

Lemna minor - Se evaluó la cantidad de “Mn biorremovido” directamente del agua, a partir de la toma de muestras de 50 ml. Las muestras fueron predigeridas con 10 ml de HNO_3 (grado reactivo) durante 24 horas; posteriormente, se realizó la digestión a $150^\circ C$ durante 60 minutos. Las muestras se filtraron y aforaron a 20 ml, para proceder a su lectura en EAA. Se cuantificó el “Mn bioadsorbido”, a partir de muestra de 1 g de peso fresco de biomasa de *L. minor*, la cual pasó a matraz Erlenmeyer de 250 ml (contenido de 50 ml de solución EDTA 0,02 M); se agitaron las muestras en agitador orbital (200 rpm) durante una hora, estimulando la desorción del metal; posteriormente se retiró la biomas y se pasó a otro matraz Erlenmeyer de 500 ml (250 ml de agua desionizada), se agito nuevamente (200 rpm, 10 minutos), para eliminar los remanentes de la solución EDTA. El sobrenadante (solución de EDTA y agua desionizada), pasan a digestión con 10 ml de HNO_3 (grado reactivo) durante 24 horas, para posteriormente ser analizados por EAA. La biomasa lavada, obtenida luego del proceso de agitación descrito en el paso anterior, se dejó escurrir durante 15 minutos sobre papel filtro doblado por la mitad; se procedió a registrar su peso fresco (pf); posterior a ello las muestras pasaron al proceso de secado en horno a $85^\circ C$, durante 24 horas. La biomasa fue predigerida en tubos de digestor con 10 ml de HNO_3 concentrado (grado reactivo), durante 24 horas. Posteriormente, las muestras se digirieron a $150^\circ C$ durante una hora. Se dejó enfriar, se agregó HNO_3 hasta que la muestras se aclaró, para posteriormente proceder a su lectura por EAA, cuantificando el “Mn bioabsorbido” (Tabla 2).

Chlorella sp - Se tomaron muestras de 50 ml procedentes de cada reactor, de cada tratamiento, y del control. Dichas muestras se centrifugaron a 4.000 rpm, durante 15 minutos a 4°C, separando la biomasa de la solución. El sobrenadante, se colectó para evaluar posteriormente la cantidad del “Mn biorremovido” del medio. El sedimento, se trasladó a matraz Erlenmeyer de (100 ml), con contenido de 25 ml de solución de EDTA (0,02 M). Se procedió a agitar los Erlenmeyers en agitador orbital a 200 rpm, generando la desorción del metal de la pared celular. Se centrifugó nuevamente las muestras en tubos de ensayo a 4.000 rpm, durante 15 minutos. El líquido sobrenadante es puesto a reaccionar con 5 ml de HNO₃ concentrado (grado analítico), durante 24 horas, y posteriormente dichas muestras son leídas en EAA evaluando la cantidad de “Mn bioadsorbido”. El sedimento obtenido a partir de la centrifugación, es secado en horno a 105°C durante 12 horas; posteriormente se evaluó el peso de la muestra, y se procedió a pasar las muestras a la etapa de predigestión durante 24 horas con 1 ml de HNO₃ concentrado (grado reactivo) a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó la etapa de digestión al acelerar la reacción al someter las muestras a 150°C durante 60 minutos. En la siguiente etapa se agregó HNO₃ hasta que la muestra se aclaró y se procedió a diluir las muestras hasta alcanzar el volumen adecuado. Finalmente, las muestras son leídas mediante EAA, determinando la concentración del “Mn bioabsorbido” (Tabla 2).

El monitoreo del Mn biorremovido, bioabsorbidos y bioadsorbido, se realizó cada cuatro días y por duplicado, por reactor. El porcentaje de Biorremoción (%Biorremoción), bioabsorción (% Bioabsorción) y bioadsorción (% Bioadsorción), se estimaron de acuerdo a Nacorda [89]:

2.10 PORCENTAJE DE BIORREMOCIÓN EN EL AGUA

$$\% \text{Biorremoción} = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100$$

Donde, C_0 : es el control o concentración inicial del metal en el medio (mg/l); y C_1 : es la concentración final del metal en el medio (mg/l).

2.11 PORCENTAJE DE BIOABSORCIÓN

$$\% \text{Bioabsorción} = \frac{\text{Concentración del metal intracelular}}{C_0} \times 100$$

Donde, tenemos la concentración del metal intracelular (absorbido por la biomasa) (mg/l); C_0 ; es el control, concentración inicial del metal en el medio (mg/l).

2.12 PORCENTAJE DE BIOADSORCIÓN

$$\% \text{Bioadsorción} = \frac{\text{Concentración del metal en el lavado EDTA}}{C_0} \times 100$$

Donde, tenemos la concentración del metal presente en el líquido sobrenadante producto de la desorción con EDTA a partir de la pared celular de las células ("Mn adsorbido por la biomasa) (mg/l); y C_0 ; es el control, la concentración inicial del metal en el medio (mg/l).

El factor de acumulación intracelular (FAI) y de adsorción (FAD), se calcularon a partir de las fórmulas propuestas por Sánchez-Galván [105]:

$$FAI = \frac{\text{Concentración del metal acumulado intracelularmente (mg/kg)}}{\text{Concentración inicial del metal en la solución (mg/l)}}$$

$$FAD = \frac{\text{Concentración del metal adsorbido en la superficie celular (mg/kg)}}{\text{Concentración inicial del metal en la solución (mg/l)}}$$

El factor de bioconcentración (FBC), fue calculado para cuantificar el potencial de remoción de Mn por parte de *L. minor* y *Chlorella sp.* Fue calculado a partir de la fórmula propuesta por Zayed [124]:

$$FBC = \frac{\text{Concentración del metal en el tejido de la biomasa cosechada (mg/kg)}}{\text{Concentración inicial del metal en la solución (mg/l)}}$$

2.13 LA CINÉTICA DE ELIMINACIÓN DE MN²⁺ EN LA COLUMNA DE AGUA

Fue estimada a partir del trabajo de Sánchez-Galván [106], de tal manera que se describió la variación del Mn²⁺ en la columna de agua en función del tiempo; a partir de la utilización de dos modelos cinéticos:

- Modelo de una cinética de primer orden descrito a partir de la expresión:

$$\frac{-dC}{dt} = K_1 C$$

Ecuación que se resuelve como:

$$\ln C = -kt + \ln C_0$$

Donde:

C_0 y C = representan la concentración de Mn^{2+} en la columna de agua, en el tiempo cero y tiempo t , respectivamente ($mg\ l^{-1}$)

k = Es la constante de velocidad (1/días)

t = tiempo (días)

- Modelo de una cinética de segundo orden, descrito a partir de la ecuación:

$$\frac{dC}{dt} = -k_2 C^2$$

Ecuación que se resuelve como:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + k/2 t$$

Donde:

C_0 y C = representan la concentración del Mn^{2+} en la columna de agua al tiempo cero y tiempo t , respectivamente ($mg\ l^{-1}$.)

K_2 = es la constante de velocidad ($L/mg\ h$)

t = tiempo (h)

2.14 CINÉTICA DE ADSORCIÓN

Para evaluar el perfil de adsorción de Mn^{2+} en la biomasa de *L. minor* y *Chlorella sp*, se utilizaron dos modelos de velocidad; la cinética de pseudo-primer orden y la cinética de pseudo-segundo orden. A la cinética de pseudo-primer orden se le conoce como el modelo de Lagergren y se expresa como [71]:

$$\frac{dq}{dt} = k_1 (q_e - q_t)$$

La cual se resuelve como:

$$\ln (q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t$$

Donde:

q_t y q_e = son la capacidad de adsorción (mg/g) al tiempo t (días) y en el equilibrio, respectivamente.

K_1 = es la constante de velocidad de la adsorción de primer orden (1/días).

Cinética de pseudo-segundo orden [49]:

$$\frac{dq}{dt} = k_2 (q_e - q_t)^2$$

La cual se resuelve como:

$$\frac{t}{q} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e}$$

Adicionalmente:

$$k_2 q_e^2 = h$$

Donde:

t = es el tiempo de contacto (h)

q_t y q_e = son la capacidad de adsorción (mg/g) al tiempo t y en el equilibrio, respectivamente.

k_2 = es la constante de velocidad de la adsorción de pseudo-segundo orden (g/mg h).

h = es la velocidad inicial de adsorción (mg/g h).

2.15 CINÉTICA DE ACUMULACIÓN INTRACELULAR

Se evaluó la acumulación intracelular en *L. minor* y *Chlorella sp*, a partir del modelo de Michaelis–Menten [1].

$$V = \frac{V_{max} [Mn]}{k_m + [Mn]}$$

Donde:

V = velocidad de la acumulación intracelular del Mn²⁺ al tiempo t (mg/g biomasa h).

V_{max} = velocidad máxima de la acumulación intracelular del Mn²⁺ (mg/g biomasa h).

K_m = concentración de Mn²⁺ a la cual se obtiene la mitad de la velocidad máxima de acumulación intracelular (mg/l).

[Mn] = concentración del Mn²⁺ en la solución (mg/l).

2.16 TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

El proyecto se realizó a partir de método Batch, de dos experimentos consecutivos, a través del cual se evaluó la capacidad de remoción de Mn²⁺ y SST. El agua residual de la central térmica fue tratado inicialmente en reactores (dos reactores por tratamiento) con la macrófita *Lemna minor* (durante 16 días), y posteriormente el efluente de dichos reactores, pasó a un segundo grupo de reactores (dos reactores por tratamiento) que fueron inoculados con la microalga

Chlorella sp (durante 16 días) (Figura 1). Se establecieron dos tratamientos; el tratamiento uno (T1) con agua residual; y el tratamiento dos (T2), agua residual esterilizada en autoclave (20 minutos a una temperatura de 121°C). La comparación frente a los dos tratamiento, permitió evaluar la capacidad de *L. minor* y *Chlorella sp*, de biorremediar con competencia y sin competencia. Control 1 (Agua residual sin esterilizar y sin inóculo); el cual permitió evaluar la depuración natural del medio sin incluir organismos. Control 2 (agua limpia, enriquecida con nutrientes); empleado como punto de referencia, para los parámetros de crecimiento evaluados (Tabla 2, Figura 1).

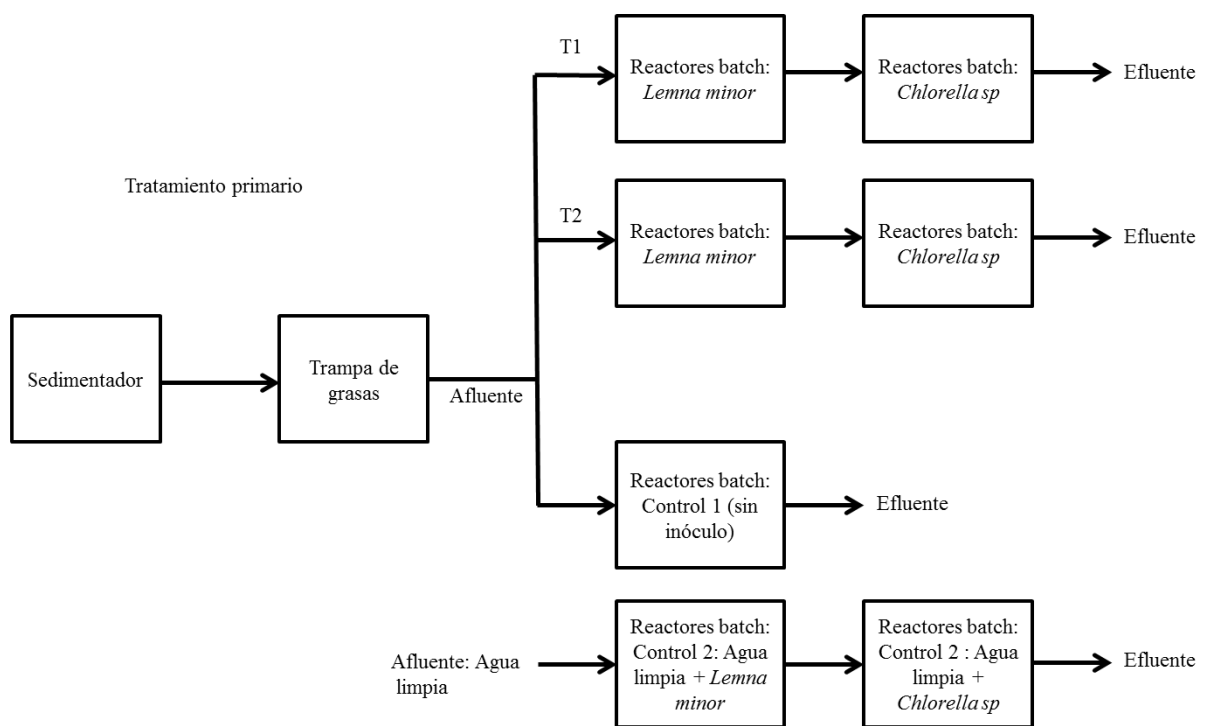
2.17 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, para cada experimento, evaluando diferencias entre las muestras y variables evaluadas. Para las variables con diferencias significativas entre tratamientos o con el tiempo ($P < 0,05$), se realizaron pruebas post hoc de Tukey, prueba que permitió realizar comparaciones entre las medias de los dos tratamientos ($\alpha \leq 0.05$). Se utilizó el software SPSS (versión 13,0 para Windows).

Para lograr que todos los parámetros cumplieran con las suposiciones de normalidad y homogeneidad de varianza (previo al ANOVA), en el experimento con *L. minor*, se transformaron los parámetros área foliar (raíz x), Mn^{2+} absorbido (ln), %biorremoción (ln), factor de adsorción (FAD) (ln), los sólidos suspendidos totales (SST) (ln), clorofila a (Box-Cox), clorofila b (Box-Cox), clorofilas totales ($\log(x+1)$), peso seco (ln); y para el experimento con *Chlorella sp* se transformaron los parámetros, densidad celular (ln), %bioabsorción (Box-Cox), %bioadsorción (ln), factor de acumulación intracelular (FAI) (ln), FAD (ln), factor de bioconcentración (FBC) (ln), SST (ln), clorofila a (Box-Cox), clorofila b (Box-Cox), clorofilas totales

(Box-Cox), y carotenos (Box-Cox) [123]. Se realizaron correlaciones lineales, mediante prueba de correlaciones bivariada de Pearson, empleando el software SPSS (versión 13,0 para Windows).

Figura 1. Representación del esquema de biorremediación desarrollado en la investigación, empleando la macrófita, *L. minor* y la microalga, *Chlorella sp.* Tratamiento 1 (T1): Agua residual con inóculos. Tratamiento 2 (T2): Agua residual esterilizada, con inóculos. Control 1: Agua residual sin inóculos. Control 2: Agua limpia con inóculos.



Con el propósito de establecer la capacidad de *L. minor* y *Chlorella sp.*, en su capacidad para remover Mn^{2+} , se realizó una evaluación periódica de la remoción en el tiempo del Mn^{2+} por parte de los organismos, evaluando las eficiencias de absorción, adsorción y biorremoción, así como de los factores de absorción (FAI), adsorción (FAD) y de bioconcentración (FBC). En el trabajo se discutirá la capacidad de remoción del Mn^{2+} fundamentalmente en términos de eficiencias o

porcentajes de bioabsorción, bioadsorción y biorremoción, así, como de FAI, FAD y FBC.

3. RESULTADOS

3.1 EFICIENCIAS DE BIORREMOCIÓN (BIOABSORCIÓN, BIOADSORCIÓN Y BIORREMOCIÓN) DEL METAL PESADO

L. minor, presentó una alta y significativa capacidad de biorremover el Mn^{2+} , a partir de mecanismos, como la bioabsorción y la bioadsorción. La mayor eficiencia de bioabsorción se evaluó en el T1, con un significativo y mayor porcentaje de remoción el día 16 (Tabla 3; Figura 2a). Por lo contrario, dicha macrófita, presentó una mayor eficiencia de bioadsorción en el T2, exhibiendo su máxima eficiencia los días 12 y 16. En general, el principal mecanismo evaluado, como generador de la significativa capacidad de *L. minor* para remover el Mn^{2+} , fue su gran eficiencia de bioadsorción. *L. minor*, presentó una mayor eficiencia de biorremoción, en los tratamientos, frente a la muy limitada depuración del control; la mayor eficiencia de biorremoción se evaluó en el T1, con un 66,47% (día 16), frente a un 46,90% (día 16) en el T2, y un 4,42% en el control (Tabla 4; Figura 2a, b; 3a).

Chlorella sp, exhibió una significativa capacidad de remover Mn^{2+} , mediante los mismos mecanismos evaluados como significativos en *L. minor*. Se evaluó la mayor biorremoción del Mn^{2+} en el T2, con las mayores eficiencias de biorremoción, entre los días 12 y 16 (Figura 3b; 4b). En el T1 se evaluó la mayor capacidad y eficiencia de bioabsorción y bioadsorción de Mn^{2+} , siendo mayor el porcentaje de remoción del Mn^{2+} , mediante bioabsorción; a pesar de dichas eficiencias (Figura 3b; 4b). *Chlorella sp*, presento una capacidad de biorremoción del Mn^{2+} , del 7,73% en el T1, 30,48% en el T2, y frente a una depuración natural en el control del 38,42%; valores porcentuales calculados a partir de la c_i , del patrón, evaluado previo a los experimentos (Tabla 4). *L. minor* y *Chlorella sp*,

lograron una biorremoción conjunta de un 74,20% en el T1 y un 77,38% en el T2 (Tabla 4).

Tabla 3. ANOVA de dos vías, para la evaluación de la capacidad de biorremoción de Mn²⁺ y SST, por *L. minor* y *Chlorella sp.* * P < 0,050, ** P < 0,01, * P < 0,001. NS: No significativo.**

ANOVA									
<i>Lemna minor</i>					<i>Chlorella sp</i>				
Parámetro	Fuente de Variación	df	F	P	Parámetro	Fuente de Variación	df	F	P
MnBioabsorbido	Tratamientos	1	18,516	***	MnBioabsorbido	Tratamientos	1	10,556	**
	Tiempo (días)	3	50,340	***		Tiempo (días)	3	30,936	***
	TxT	3	13,391	***		TxT	3	4,748	**
	Error	24				Error	24		
MnBioadsorbido	Tratamientos	1	10,565	**	MnBioadsorbido	Tratamientos	1	177,952	***
	Tiempo (días)	3	18,3913	***		Tiempo (días)	3	7,453	***
	TxT	3	2,526	NS		TxT	3	3,651	*
	Error	24				Error	24		
MnBiorremovido	Tratamientos	2	253,85	***	MnBiorremovido	Tratamientos	2	46,9614	***
	Tiempo (días)	3	31,53	***		Tiempo (días)	3	6,2833	***
	TxT	6	8,53	***		TxT	6	0,2583	*
	Error	36				Error	36		
%Bioabsorción	Tratamientos	1	1,168	***	%Bioabsorción	Tratamientos	1	128,404	***
	Tiempo (días)	3	50,340	***		Tiempo (días)	3	21,164	***
	TxT	3	13,391	***		TxT	3	0,7641	*
	Error	24				Error	24		
%Bioadsorción	Tratamientos	1	10,565	***	%Bioadsorción	Tratamientos	1	11,91	**
	Tiempo (días)	3	18,391	***		Tiempo (días)	3	3,10	*
	TxT	3	2,526	NS		TxT	3	1,18	NS
	Error	24				Error	24		
%Biorremoción	Tratamientos	1	13,539	***	%Biorremoción	Tratamientos	2	15,028	***
	Tiempo (días)	3	25,914	***		Tiempo (días)	3	4,794	***
	TxT	3	4,184	***		TxT	6	0,360	NS
	Error	24				Error	36		
FAI	Tratamientos	1	7,0719	*	FAI	Tratamientos	1	104,43	***
	Tiempo (días)	3	4,8756	**		Tiempo (días)	3	58,63	***
	TxT	3	13,619	***		TxT	3	13,12	***
	Error	24				Error	24		
FAD	Tratamientos	1	18,60	**	FAD	Tratamientos	1	1,515	NS
	Tiempo (días)	3	5,62	***		Tiempo (días)	3	40,190	***
	TxT	3	0,98	NS		TxT	3	4,005	*
	Error	24				Error	24		
FBC	Tratamientos	1	10,145	***	FBC	Tratamientos	1	48,056	***

Tabla 3. Continuación									
SST	Tiempo (días)	3	9,1453	**	SST	Tiempo (días)	3	55,786	***
	TxT	3	0,3203	NS		TxT	3	12,603	***
	Error	24				Error	24		
	Tratamientos	2	7,729	***		Tratamientos	2	7,729	***
	Tratamientos	2	29,202	***		Tratamientos	2	263,612	***
	Tiempo (días)	3	12,234	***		Tiempo (días)	3	16,642	***
Clorofila a	TxT	6		*	Clorofila a	TxT	6		***
	Error	60				Error	60		
	Tratamientos	2	2,666,229	***		Tratamientos	2	26,122	***
	Tiempo (días)	3	23,607	***		Tiempo (días)	3	25,005	***
Clorofila b	TxT	6	3,827	**	Clorofila b	TxT	6	34,823	***
	Error	60				Error	60		
	Tratamientos	2	5,826	**		Tratamientos	2	59,507	**
	Tiempo (días)	3	9,467	***		Tiempo (días)	3	13,129	***
Clorofilas totales	TxT	6	2,295	*	Clorofilas totales	TxT	6	0,2964	**
	Error	60				Error	60		
	Tratamientos	2	14,195	***		Tratamientos	2	43,347	***
	Tiempo (días)	3	25,257	***		Tiempo (días)	3	24,213	***
Carotenoides totales	TxT	6	4,170	***	Carotenoides totales	TxT	6	25,688	***
	Error	60				Error	60		
	Tratamientos	2	11,413	***		Tratamientos	2	9,735	***
	Tiempo (días)	3	8,575	***		Tiempo (días)	3	4,835	***
Peso fresco	TxT	6	1,135	NS	Peso seco	TxT	6	15,447	***
	Error	60				Error	60		
	Tratamientos	2	847,9	***		Tratamientos	2	30,187	***
	Tiempo (días)	3	858,2	***		Tiempo (días)	12	27,695	***
Peso seco	TxT	6	25,5	***	Densidad celular	TxT	24	10,985	***
	Error	60				Error	90		
	Tratamientos	2	7,98	***		Tratamientos	2	207	**
	Tiempo (días)	3	16,62	***		Tiempo (días)	12	574	**
Área foliar	TxT	6	0,223	NS	Área foliar	TxT	24	39	**
	Error	60				Error	180		
	Tratamientos	2	6,514	***					
	Tiempo (días)	3	3,638	***					
	TxT	6	0,343	NS					
	Error	180							

L. minor, removió un significativo porcentaje de Mn^{2+} del agua, por lo tanto, las concentraciones de entrada a los reactores con *Chlorella sp*, fueron menores a la c_i patrón (Tabla 5). Respecto a las concentraciones de entrada a cada experimento, las eficiencias de biorremoción para *L. minor* fue del 66,47% en el

T1, y del 46,90% en el T2; y para *Chlorella sp* del 29,89% en el T1, y del 66,29% para el T2 (Tabla 5).

La remoción del Mn²⁺ varió en el tiempo, así como la relevancia del mecanismo (absorción, adsorción) y la cuantía de la remoción desplegada por *L. minor* y *Chlorella sp* (Tabla 6).

Tabla 4. Eficiencia de biorremoción del Mn²⁺ y de los SST, mediante *L. minor* y *Chlorella sp*; respecto a la concentración inicial del efluente (C₀), evaluada previo a los experimentos. Tratamiento 1 (1), tratamiento 2, control 1 (C₁). Cantidad = medias + error estándar (Std Err).

Parámetros	<i>Lemna minor</i>			Parámetros	<i>Lemna minor</i>		
	1	2	C ₁		1	2	C ₁
C ₀ (T ₀) (mg/l)	1,14	1,14	1,14	C ₀ (T ₀) (mg/l)	140,00	140,00	1,14
% Biorremoción Mn	66,47±1,58	46,90±5,02	4,42±0,56	% Biorremoción SST	80,40±5,57	62,82±4,23	29,78±0,38
	<i>Chlorella sp</i>				<i>Chlorella sp</i>		
% Biorremoción Mn	7,73	30,48	38,42	% Biorremoción ST	19,45	34,13	11,46
Biorremoción total (%)	74,20	77,38	38,84		99,85	96,95	41,31

Se estableció una correlación positiva entre el área foliar (AF) de *L. minor* y la eficiencia de bioadsorción (%bioadsorción). Encontrando, como a mayor AF, se logró una mayor eficiencia en la bioadsorción. El T2, presentó las mayores eficiencias en la bioadsorción, con mayores AF (Figura 5). Se estableció una correlación negativa, entre la densidad celular de *Chlorella sp* y la eficiencia de bioabsorción (%bioabsorción), estimando que, con menores densidades celulares, se logró una mayor eficiencia en la bioabsorción, con mayor magnitud en el T1 (Figura 5).

Tabla 5. Eficiencia de biorremoción del Mn²⁺ y de los SST, mediante *L. minor* y *Chlorella sp*; respecto a la concentración inicial (C_i) de entrada en cada experimento. Tratamiento 1 (1), tratamiento 2 (2), control (C₁). Cantidad = medias + error estándar (Std Err).

Parámetros	<i>Lemna minor</i>			<i>Chlorella sp</i>		
	1	2	C ₁	1	2	C ₁
Tratamiento						
C _i Mn	1,14	1,14	1,14	0,42	0,76	0,99
% Biorremoción Mn	66,47±1,58	46,90±5,02	4,42±0,56	29,89±5,78	66,29±2,76	31,13±2,15
C _i SST (mg/l)	140,00	140,00	140,00	27,44	47,89	98,20
% Biorremoción SST	80,40±5,57	62,82±4,23	29,78±0,38	99,22±0,52	99,77±0,11	16,33±0,67

Tabla 6. Concentraciones de Mn²⁺ a lo largo de los 16 días de exposición para los experimentos con *L. minor* y *Chlorella sp*. Cantidad = medias + error estándar (Std Err). Mn²⁺ AB (absorbido); Mn²⁺ AD (adsorbido); Mn²⁺ BIO (bioremovido). La concentración del manganeso en *L. minor*, está dada en mg kg⁻¹ de peso seco.

Tiempo (días)	Tratamiento	Organismo					
		<i>Lema minor</i>			<i>Chlorella sp</i>		
		Mn ²⁺ AB (mg kg ⁻¹)	Mn ²⁺ AD (mg kg ⁻¹)	Mn ²⁺ BIO (mg kg ⁻¹)	Mn ²⁺ AB (mg l ⁻¹)	Mn ²⁺ AD (mg l ⁻¹)	Mn ²⁺ BIO (mg l ⁻¹)
4	1	0,062±0,01	0,188±0,08	0,917±0,01	0,210±0,00	0,114±0,00	0,293±0,03
4	2	0,105±0,01	0,150±0,01	0,869±0,03	0,141±0,01	0,179±0,00	0,488±0,01
8	1	0,118±0,02	0,132±0,03	0,656±0,04	0,157±0,01	0,100±0,00	0,275±0,03
8	2	0,053±0,01	0,254±0,00	0,835±0,04	0,150±0,02	0,178±0,00	0,432±0,03
12	1	0,152±0,02	0,291±0,04	0,588±0,04	0,125±0,00	0,113±0,00	0,241±0,01
12	2	0,096±0,01	0,472±0,04	0,792±0,05	0,126±0,02	0,153±0,00	0,257±0,02
16	1	0,451±0,02	0,355±0,03	0,381±0,02	0,092±0,00	0,094±0,00	0,227±0,04
16	2	0,191±0,01	0,472±0,02	0,604±0,05	0,074±0,00	0,143±0,00	0,214±0,08

3.2 FACTORES DE ADSORCIÓN (FAD), DE ACUMULACIÓN INTRACELULAR (FAI) Y DE BIOCONCENTRACIÓN (FBC)

Se evaluó un mayor FAI, en el T1, y un significativo y mayor FAD en el T2, con un mayor valor para el día 12. El mayor FBC, se evaluó en el T2; presentando las mayores cuantificaciones los días 8 y 12 del experimento con *L. minor* (Tabla 7; Figura 2c, d). *Chlorella sp.*, exhibió mayores FAI en el T1; se evaluó ausencia de diferencias significativas en la cuantificación del FAD entre tratamientos, pero presentaron diferencias significativas en la interacción tratamiento por el tiempo de exposición de las microalgas al medio con Mn^{2+} . Se evaluó el mayor FBC en el T1 (Figura 4c, d).

Tabla 7. FAI, FAD, FBC, evaluados en *L. minor* y *Chlorella sp.* Cantidad = medias + error estándar (Std Err).

Tiempo (días)	Tratamiento	Organismo					
		<i>Lema minor</i>			<i>Chlorella sp</i>		
		FAI	FAD	FBC	FAI	FAD	FBC
4	1	1027,63±208	3029,64±1240	4057,28±1095	304,258±12,1	165,857±9,02	470,115±22,45
4	2	2242,21±230	3317,46±555	5559,68±383	107,318±3,40	138,158±12,87	245,476±16,13
8	1	1736,94±272	1872,54±376	3609,48±428	361,468±50,1	228,576±22,32	590,044±69,78
8	2	926,60±92,40	4467,91±292	5394,50±286	213,418±14,1	261,106±32,07	474,524±43,78
12	1	2285,37±336	4386,33±792	6671,70±954	475,010±81,8	414,831±45,07	889,841±126,78
12	2	1402,67±67,1	6914,76±639	8317,43±574	426,655±21,2	542,625±71,20	969,280±92,90
16	1	2622,48±190	2094,60±318	4717,08±469	239,905±17,2	248,167±30,20	488,072±47,13
16	2	1554,65±69	3837,44±173	5392,09±161	84,543±6,75	165,517±8,34	250,060±10,69

3.3 CINÉTICA EN LA BIORREMEDIACIÓN DEL Mn^{2+}

Los resultados de la cinética de eliminación en *L. minor*, nos mostró que la remoción del Mn^{2+} , se ajustan mejor a un modelo cinético de eliminación de primer

orden. *L. minor*, remueve 0,0658 mg día (K días) en el T1, y 0,024 mg día (K días) en el T2 (Tabla 8). La cinética de adsorción se ajustó mejor al modelo de primer orden, los coeficientes de determinación R^2 para el T1, fueron bajos. *L. minor*, presentó una velocidad de adsorción mayor en el T2 (0,180 k) (Tabla 8). El T1 se ajustó mejor al modelo de Michaelis-Menten, la velocidad máxima de acumulación intracelular fue de 0,91557 (k mg l⁻¹), y se logró el día 4, por lo tanto, la máxima acumulación intracelular de *L. minor*, se presentó el día 8, 0.5969 mg/g por día (V_{max} (mg/g- d⁻¹)) (Tabla 8). El modelo cinético de eliminación de primer orden, es el que mejor se ajusta a los resultados del trabajo. *Chlorella sp*, eliminó 0,0353 mg de Mn²⁺ día en el T1; y 0,0796 mg de Mn²⁺ día en le T2. El T2 elimino más rápido el Mn²⁺ del agua residual (Tabla 8).

Los resultados de la cinética de adsorción, se ajustaron mejor al modelo de segundo orden; sin embargo no se logró un ajuste adecuado. Se evaluaron valores bajos en el coeficiente de determinación R^2 . El valor de la velocidad de adsorción, fue mayor en el T1 (Tabla 8). Los resultados hallador en la cinética de absorción, señalo que los dos tratamientos se ajustaron bien a la cinética de Michaelis-Menten. El T2, presentó las mayores velocidades de absorción de 0,420 (k mg l⁻¹), logrando la máxima acumulación intracelular de Mn²⁺ en *Chlorella sp*, el día 12, 0,01496 (V_{max} (mg/g- d⁻¹)) (Tabla 8).

3.4 CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE LOS SST

Se evaluó una biorremoción significativa de SST, por parte de *L. minor*, frente al control si inóculo. No se hallaron diferencias significativas entre el T1 y T2, pero sí, en la interacción entre los tratamientos y el tiempo de exposición al medio con SST. La mayor remoción se evaluó en los días 12 y 16, en los tratamientos y control (Figura 6a). Se estableció una correlación negativa entre el AF y los SST,

mediante la cual, a medida que se incrementó el AF, se redujeron los SST en el agua (mayor remoción); en el T1, con una menor AF, se logró la mayor remoción de los SST (Figura 5c). Al sustraer los SSV del total de SST, se evaluó una significativa remoción de SST, por parte de *Chlorella sp* (Figura 7).

Figura 2. Eficiencias de biorremoción, FAI, FAD y FBC, en diferentes tiempos de exposición de *L. minor* al manganeso. Las barras presentan las desviaciones estándar.

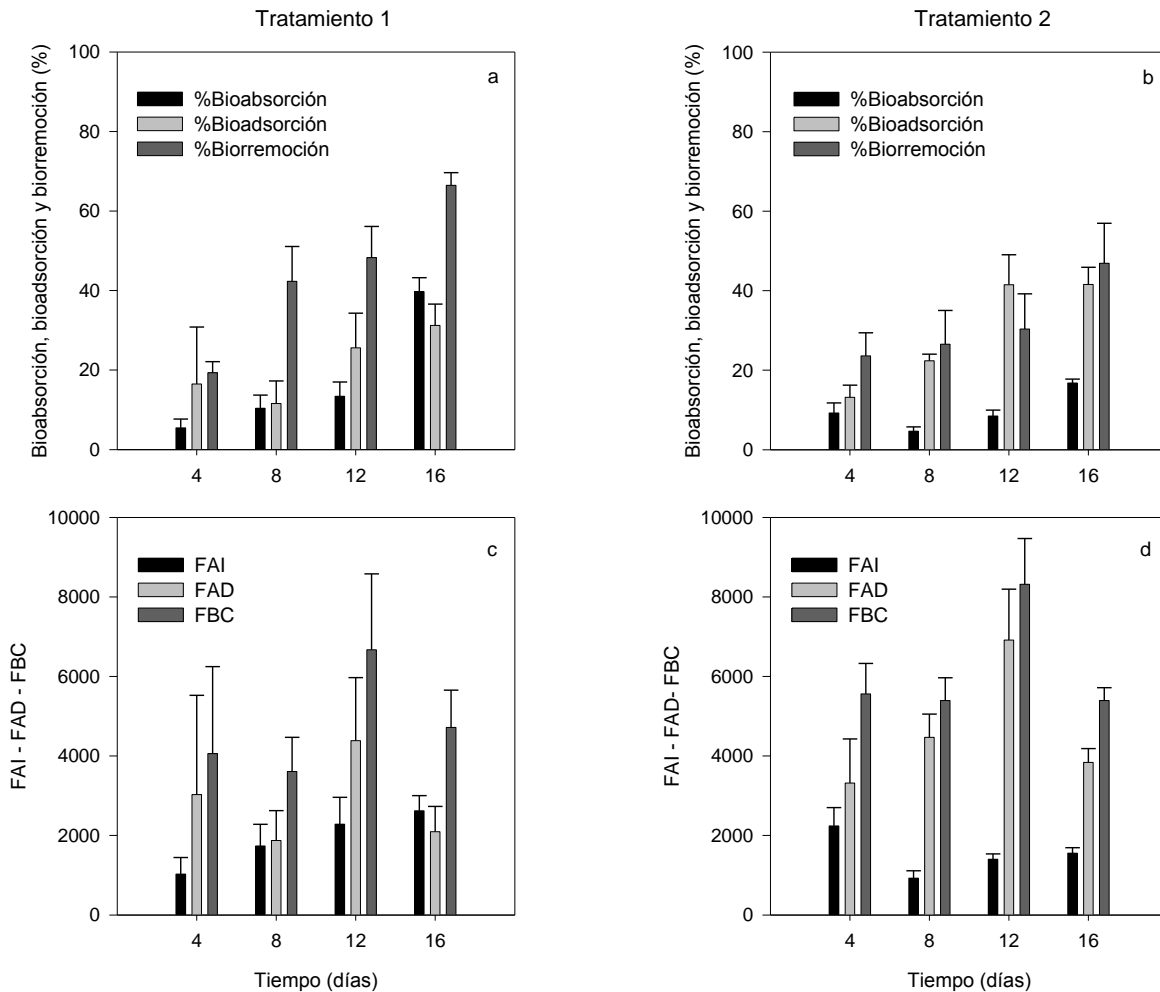
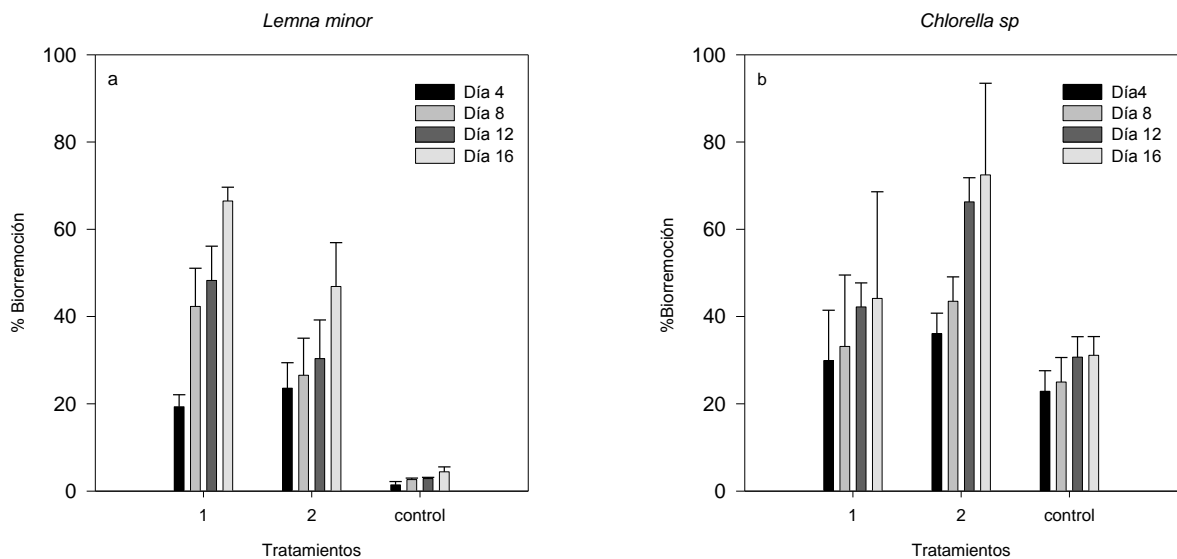
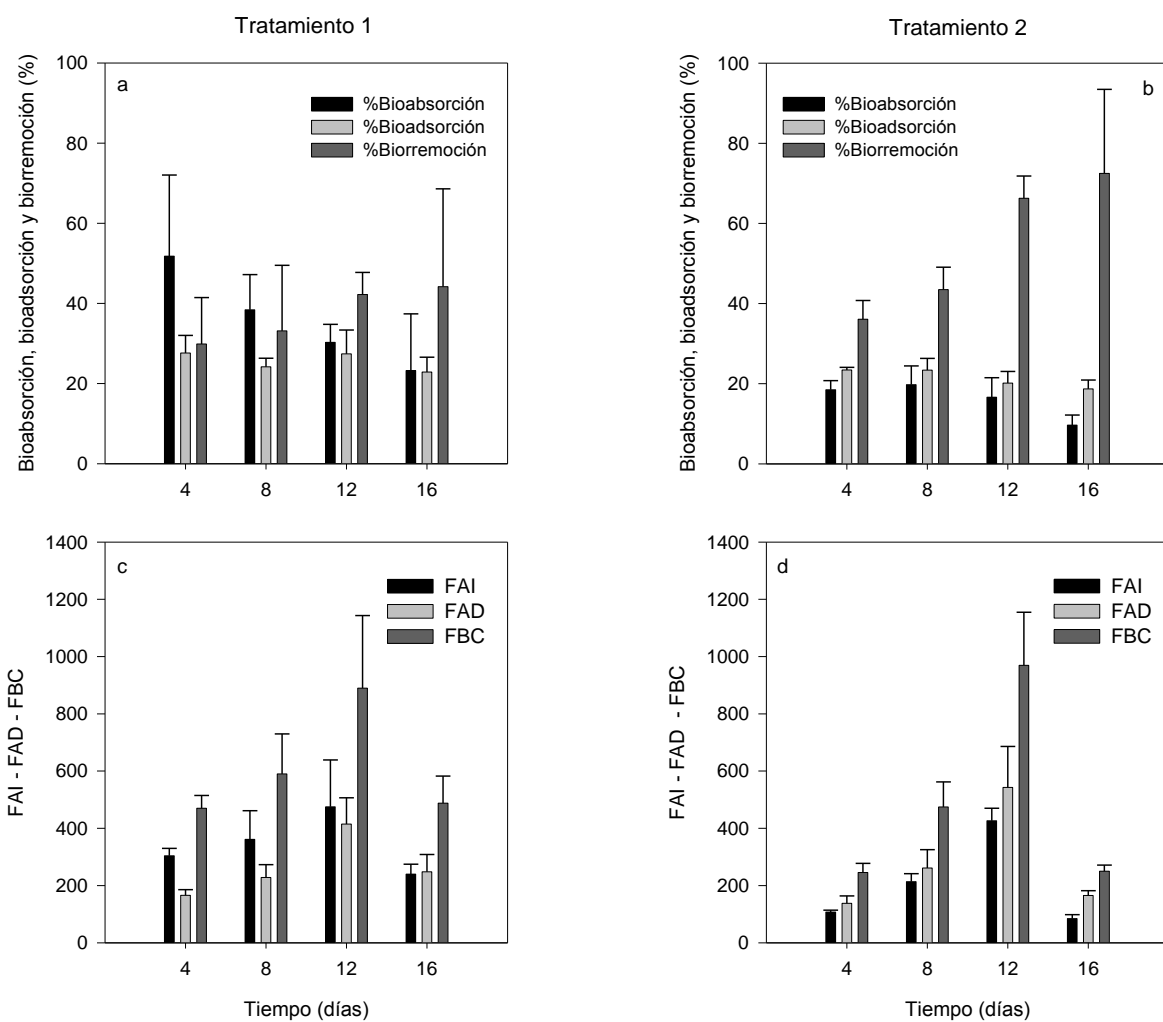


Figura 3. Eficiencias de biorremoción del Mn^{2+} , por *L. minor* y *Chlorella sp*, frente al control sin inóculo. Las barras presentan las desviaciones estándar.



L. minor, removió un 80,40% en el T1 y 62,82% en el T2, frente a una depuración natural en el control de 29,78%; porcentajes estimados a partir de la cuantificación del patrón inicial c_i , previo a los experimentos (Tabla 4). *Chlorella sp*, realizó una significativa remoción de SST, en los dos tratamientos, frente a la leve depuración natural evaluada en el control (Figura 6b). *Chlorella sp*, fue igualmente eficiente en la remoción de los SST en los dos tratamiento. Se estableció una correlación negativa entre la densidad celular y los SST; a mayor densidad celular, menores SST, y por lo tanto, mayor eficiencia (Figura 5d). El estudio realizado permite establecer, que respecto a la cuantificación inicial de SST realizada previo a los experimentos, *Chlorella sp*, removió un 19,45% en el T1 y 34,13% en el T2, frente a una depuración en el control del 11,46% (Tabla 4). *L. minor* y *Chlorella sp*, removieron en conjunto, un 99,85% en le T1 y un 96,95% en el T2; la depuración natural en el control fue del 41,31% (Tabla 4).

Figura 4. Eficiencias de biorremoción, FAI, FAD y FBC, en diferentes tiempos de exposición de *Chlorella sp* al manganeso. Las barras presentan las desviaciones estándar.



La remoción significativa realizada por *L. minor*, durante el primer experimento, redujo la concentración de los SST, por lo tanto, la concentración que entró a los reactores inoculados con *Chlorella sp*, fueron inferiores a la concentración patrón original; a partir de ello se cuantifico el porcentaje de remoción de dicha concentración inicial en cada reactor. *L. minor*, como ya se reportó, removió,

removió un 80,40% en el T1 y 62,82% en el T2, y *Chlorella sp*, un 99,22% en el T1 y 99,77% en el T2 (Tabla 5).

Figura 5. Correlaciones lineales mediante prueba de Pearson. *L. minor*: 6a) regresión lineal entre los SST y el AF (estimado: 1091,43; probabilidad: 0,0008*); 6b) regresión lineal entre el %bioadsorción y el AF (estimado: 835,992; probabilidad: 0,0136*). *Chlorella sp*: correlación entre el %bioabsorción y la densidad celular (estimado: -3,744⁻⁶; probabilidad: <0,0001*); correlación entre los SST y la densidad celular (estimado: -6,67⁻⁷; probabilidad: <0,0007*).

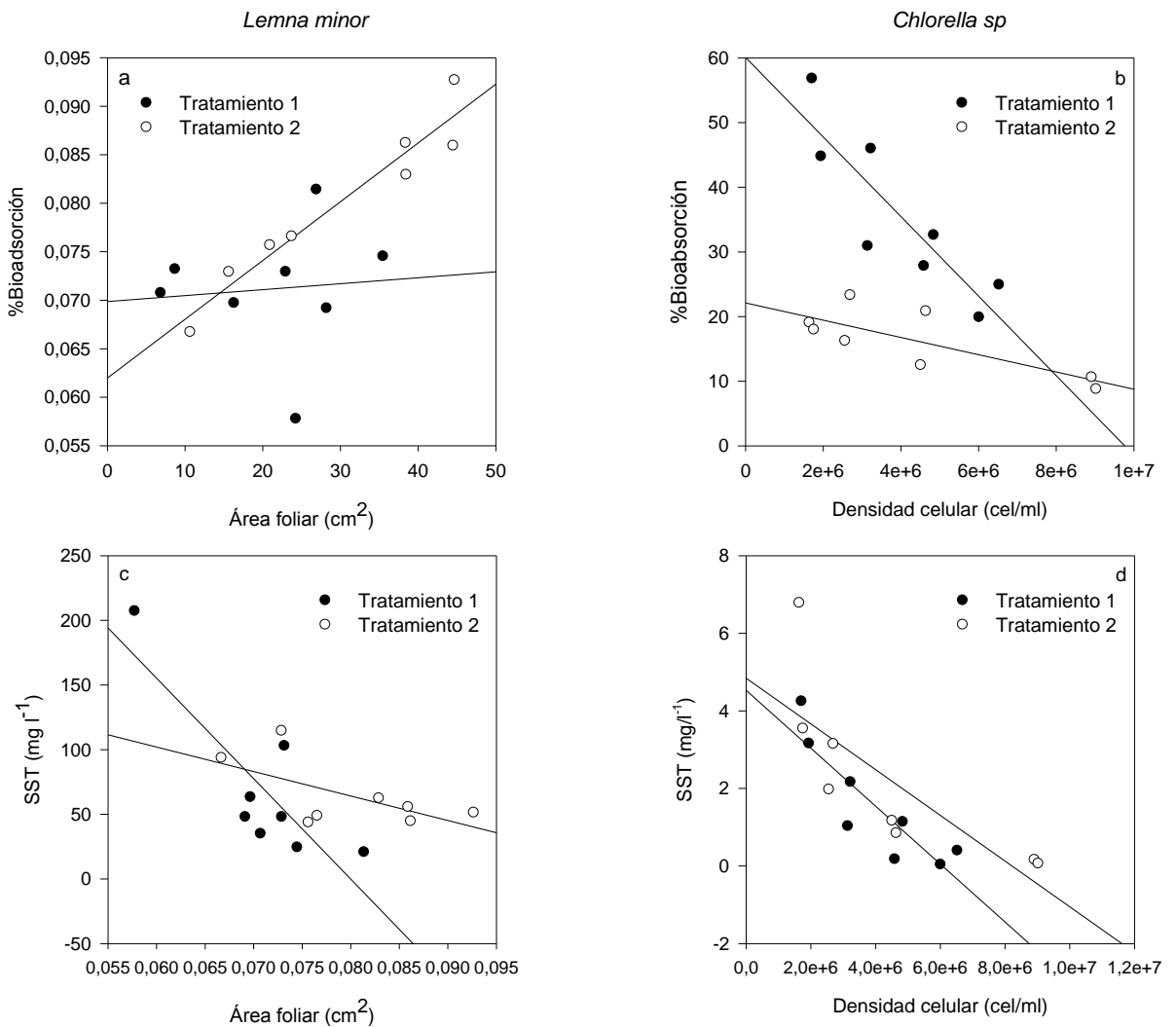


Tabla 8. Cinética de eliminación y de acumulación intracelular en *L. minor* y *Chlorella sp.*

Cinética de eliminación <i>L. minor</i>					Cinética de eliminación <i>Chlorella sp</i>				
T	Ci	Cinética de primer orden			Ci	Cinética de primer orden			
		K (1/días)	R ²			K (1/días)	R ²		
T1	1,14	0,0658	0,9735		0,42	0,0353	0,8779		
T2	1,14	0,0240	0,7337		0,76	0,0796	0,9698		
Cinética de adsorción <i>L. minor</i>					Cinética de adsorción <i>Chlorella sp</i>				
T	Ci	Cinética de primer orden			T	Ci	Cinética de primer orden		
		K (g/mg d ⁻¹)	R ²				K (g/mg d ⁻¹)	R ²	
T1	1,14	0,0989	0,7227		0,42	0,1172	0,7788		
T2	1,14	0,1800	0,9849		0,76	0,0245	0,6501		
Cinética de acumulación intracelular <i>L. minor</i>					Cinética de acumulación intracelular <i>Chlorella sp</i>				
Cinética de Michaelis-Menten					Cinética de Michaelis-Menten				
T1	1,14	K (mg/l)	R ²	Vmax (mg/g- d ⁻¹)	T1	0,42	K (mg/l)	R ²	Vmax (mg/g- d ⁻¹)
		0,9157	0,8864	0,5969			0,3882	0,9271	

Figura 6. Biorremoción de sólidos suspendidos totales (SST), por parte de *L. minor* y *Chlorella sp.* Las barras presentan las desviaciones estándar.

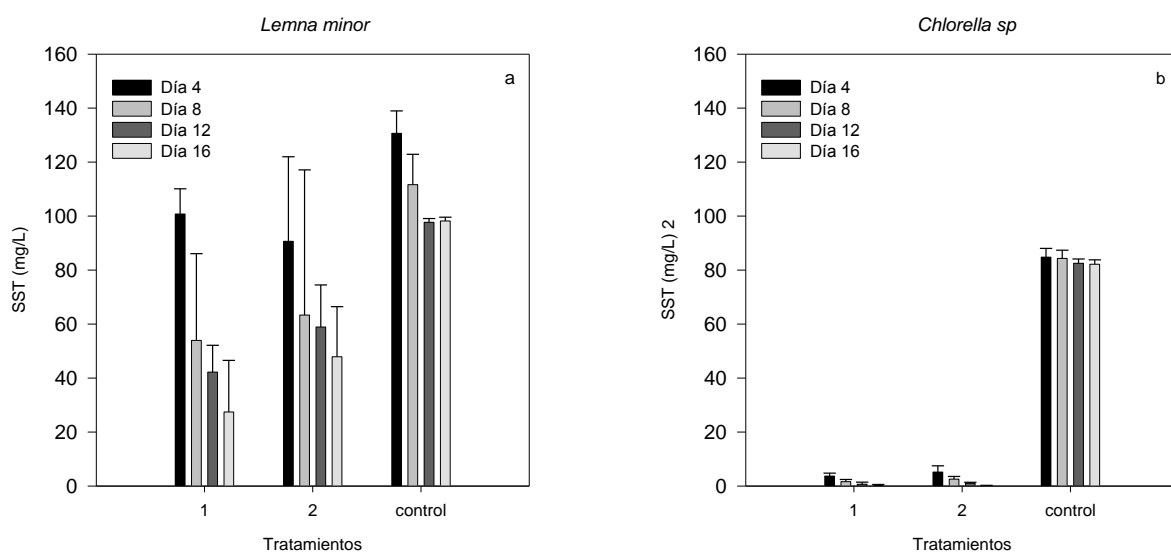
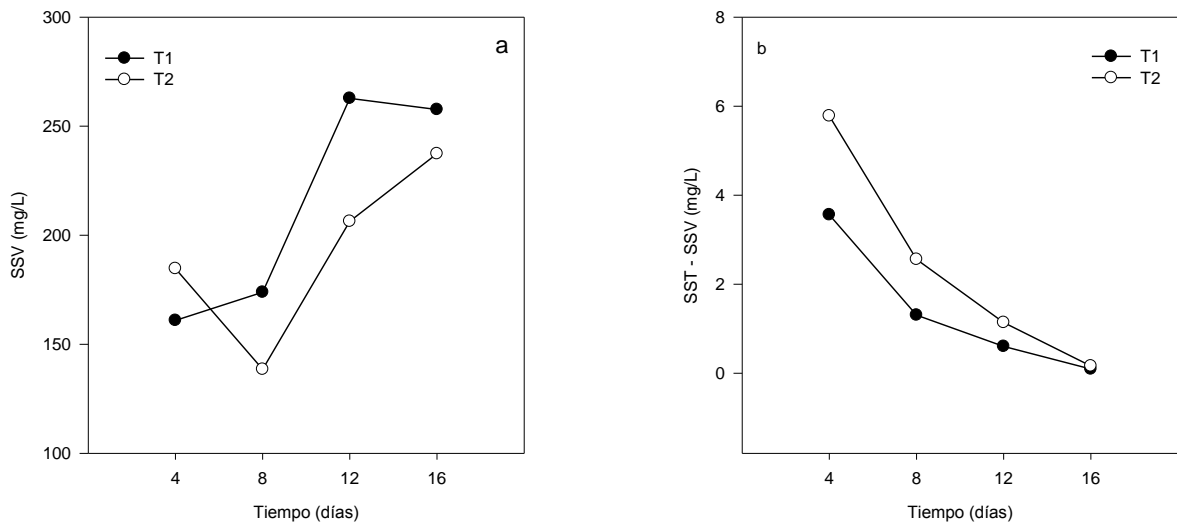


Figura 7. Relación entre la remoción de sólidos suspendidos volátiles (SSV) y sólidos suspendidos totales (SST), por parte de *Chlorella sp.*



3.5 EFECTO DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN

En general, la biorremoción del Mn^{2+} y de los SST, se incrementaron con el incremento en el tiempo de exposición en *L. minor* (Figura 2a, b; 3a; 6a). Las eficiencias de bioabsorción, bioadsorción y biorremoción, se incrementaron con el tiempo, logrando las mayores eficiencias entre los días 12 y 16 del experimento (Figura 2a, b, 3a). La mayor eficiencia y mayor incremento porcentual en la remoción del Mn^{2+} , se presentó en el T1 (Figura 2a; 3a). El FAI, FAD y FBC, de igual manera, se incrementaron siguiendo un patrón levemente similar al descrito para las eficiencias. Se presentó un mayor incremento en el tiempo, del FAD, para los dos tratamientos; y se lograron las mayores magnitudes para FAD y FBC, en el día 12 (Tabla 7; Figura 2c, d). Así mismo, la biorremoción de los SST, incrementó en el tiempo, y la mayor eficiencia se logró en el T1, con una mayor remoción el día 16 (Figura 6a).

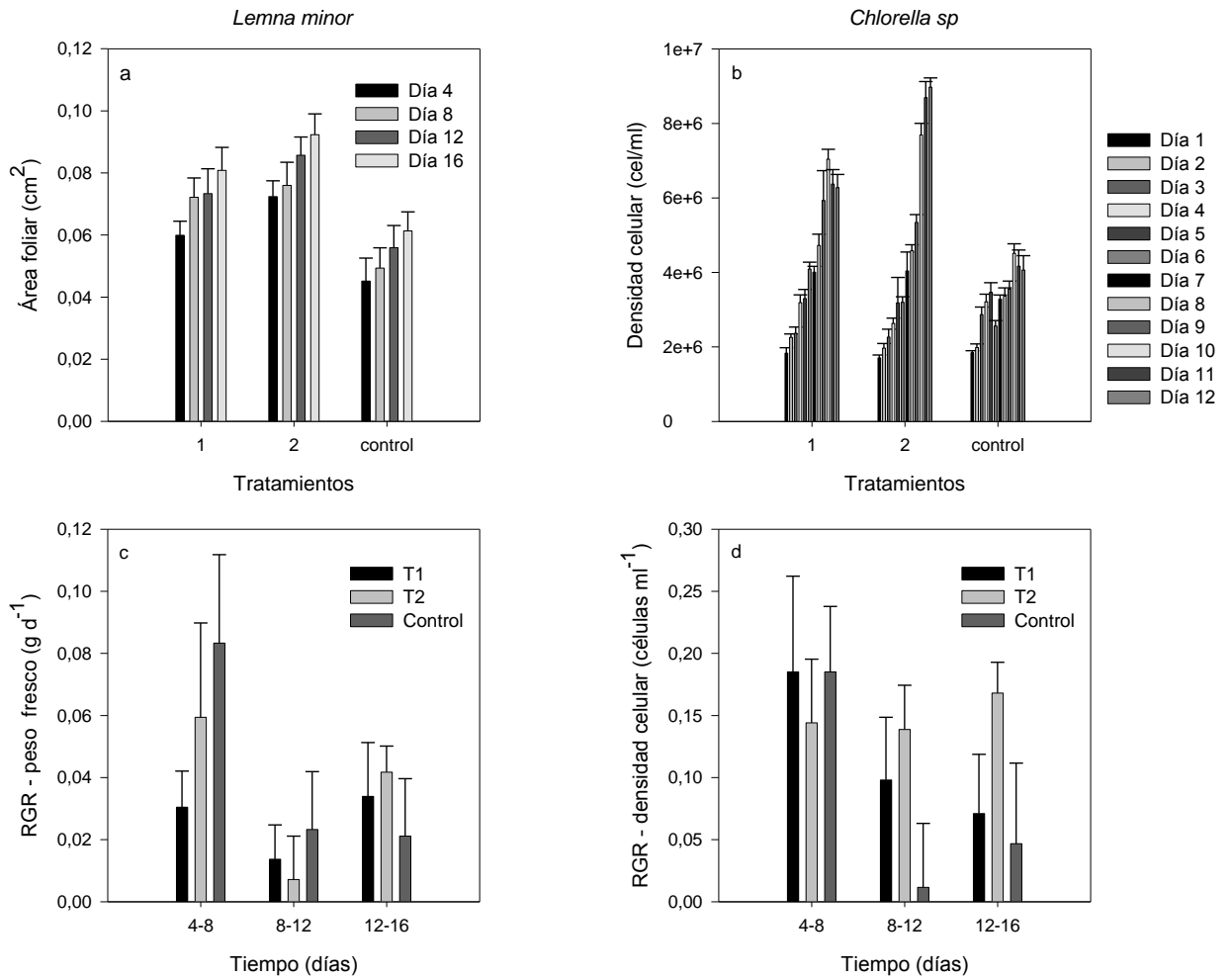
Chlorella sp., presentó fluctuaciones en las eficiencias de biorremoción (Figura 3b, 4a, b). Se presentaron dos patrones contradictorios de remoción, entre los dos tratamientos; en el T1, la mayor eficiencia de biorremoción, se evaluó durante los primeros días del experimento, declinando dichas eficiencias levemente con el incremento en el tiempo de exposición. Por lo contrario, el T2, exhibió la menor eficiencia de biorremoción durante los días 4 y 8, y sus mayor eficiencia entre los días 12 y 16, logrando la máxima eficiencia el día 12 (Figura 3b, 4b). Se evaluó la mayor eficiencia de bioabsorción en el T1, durante los primeros cuatro días de exposición, magnitud que posteriormente se redujo, presentando sus menores porcentajes entre los días 12 y 16 (Figura 4a). El T2, presentó menores eficiencias que el T1; y exhibió un patrón de respuesta similar en las eficiencias de bioabsorción y bioadsorción, con incremento durante los días 4 al 12; de reducción, entre los días 12 y 16 (Figura 4b). El FAI, FAD y FBC, se incrementaron al aumentar el tiempo de exposición, logrando las mayores tasas el día 12 para los dos tratamientos; y se redujeron significativamente el día 16 (Figura 4c, d). Los SST, se redujeron significativamente a mayor tiempo de exposición, en los dos tratamientos, y levemente en el control (Figura 6b; 7a, b).

3.6 PRODUCTIVIDAD DE LA BIOMASA

No se evaluaron síntomas de toxicidad en el crecimiento de *L. minor*, ni en *Chlorella sp.* Se evaluó un significativo incremento en el crecimiento de *L. minor* en el tiempo, con diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos y el control, en el peso fresco (PF) y AF. Los tratamientos presentaron un significativo y mayor crecimiento que el control con agua limpia. El T2, presentó un mayor incremento en PF, pigmentos fotosintéticos y AF, frente al T1 y control. Las mayores tasas de crecimiento relativo (RGR) se presentaron entre los días 4 – 8, en el control y en el T2. En general las tasas de crecimiento fluctuaron en el

tiempo, se redujeron significativamente entre los días 8 – 12; en el control siguió reduciéndose entre los días 12 – 16, y de manera contrastante, los tratamientos 1 y 2, incrementaron su RGR (Figura 8a, c).

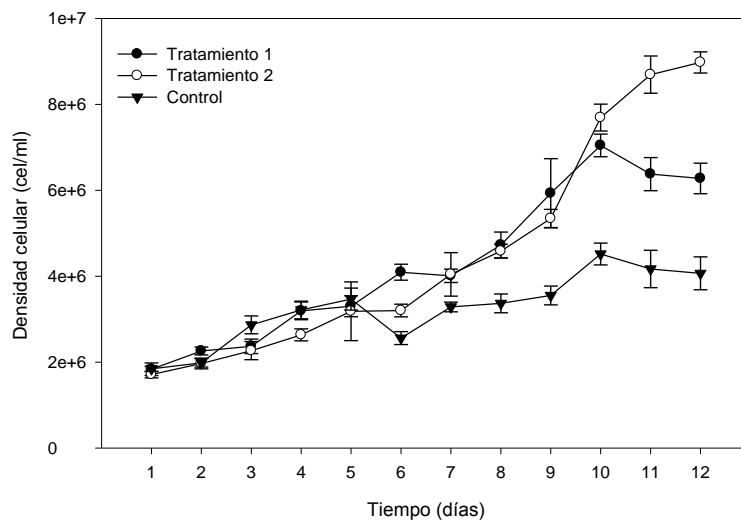
Figura 8. Tasa de crecimiento relativa (RGR), y parámetros de crecimiento evaluados en *L. minor* y *Chlorella sp.* Las barras presentan las desviaciones estándar.



El crecimiento de *Chlorella sp.*, evaluado a partir de su peso seco (PS), y la densidad celular, mostró diferencias significativas entre tratamientos y en el

tiempo. Se presentó un mayor PS, en el T1; en conjunto T1 y T2, presentaron mayores PS, que las magnitudes evaluadas en el control. El PS fluctuó en el tiempo, en los tratamientos 1 y 2, se evaluaron las mayores magnitudes, entre los días 4 y 8. La densidad celular, presentó un incremento en el tiempo, con leves fluctuaciones; el T1 y T2, presentaron significativas y mayores densidades celulares, frente al control; sin embargo, entre los T1 y T2, no se hallaron diferencias significativas. Durante los últimos tres días del experimento, se presentó una mayor densidad celular en el T2. Las mayores densidades celulares se lograron para los dos tratamientos, los últimos cuatro días del experimento. La tasa de crecimiento relativa (RGR) evaluada, permitió establecer, que las mayores RGR, se evaluaron entre los días 4 y 8, para el T1 y en el control, tasa que se reduce posteriormente. La RGR, es similar en el tiempo en el T2 (Figura 8b, d; 9).

Figura 9. Curva de crecimiento de *Chlorella sp*, a partir de la densidad celular.



3.7 PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

Se evaluaron diferencias significativas en la producción de los pigmentos fotosintéticos en el tiempo y entre tratamientos y control, en los experimentos con *L. minor* y *Chlorella sp.* En términos generales, en el experimento con *L. minor*, se evaluó un incremento en la magnitud al culminar el día 16. No se presentaron diferencias significativas en la clorofila a y carotenoides, entre el T1 y T2, siendo su magnitud mayor a la producida en el control. Se produjo una mayor cantidad de clorofila b y totales, en el tratamiento 2; la menor magnitud en clorofila b, se presentó en el T1 (Figura 10a, b, c, d). *Chlorella sp.*, presentó una mayor producción de clorofila a y clorofilas totales, en el T2 y en el control, entre los cuales, no se hallaron diferencias significativas. El control presentó la mayor producción de clorofila b, y la menor el T1. El T1 y T2, presentaron la mayor concentración de carotenoides. En general se presentó la mayor producción de pigmentos, entre los días 8 y 12 del experimento en el experimento con *Chlorella sp.* (Figura 11a, b, c, d).

3.8 VARIACIÓN DE PH Y PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS

Se evaluaron mayores valores de pH en los reactores en el experimento con *Chlorella sp.*, con pH cercanos a 8; frente a pH entre 7,10 - 7,11, evaluados en el experimento con *L. minor*. Las conductividades fueron mayores en el experimento con *Chlorella sp.* (T1: 0,94; T2: 0,96 mS). El oxígeno disuelto (OD), fue mayor en los reactores en el experimento con *Chlorella sp.* (T1: 11,06; T2: 12,22 mg/l), siempre con mayores valores por el T2. Los promedios de los porcentajes de salinidad (SAL), fueron similares en los dos experimentos, con valores mayores en control 2 (0,03), y los menores en el control 1 (0,01), para los dos experimentos.

La temperatura promedio del agua, fue levemente mayor en el T1 (*L. minor*: 18,29°C), T1 (*Chlorella sp*: 17,43°C); en general las temperaturas fueron mayores en el experimento con *L. minor* (Tabla 9).

Figura 10. Pigmentos fotosintéticos en *L. minor*. Cuantificados en mg g^{-1} ; presentados con barras que presentan la desviación estándar.

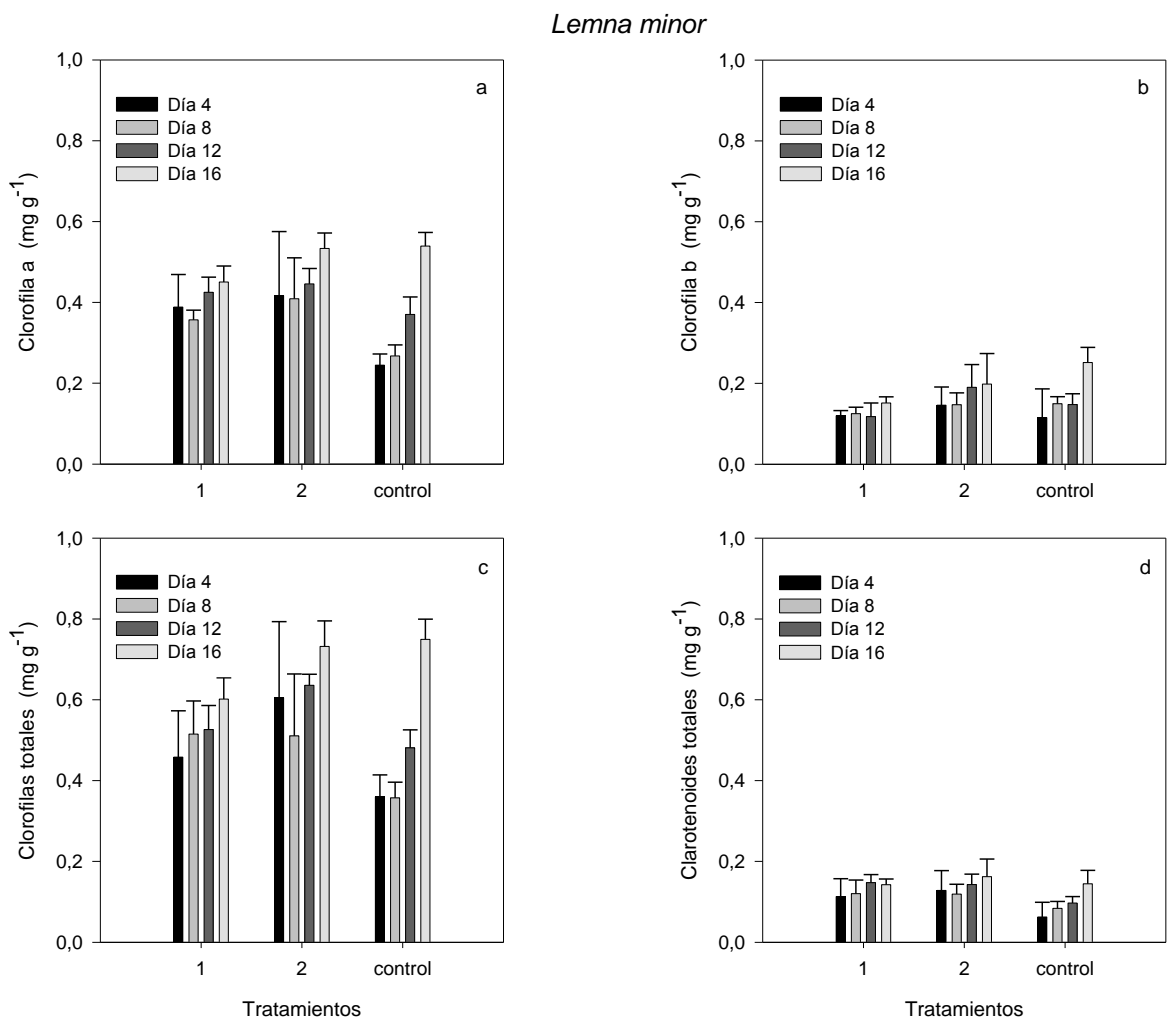


Figura 11. Pigmentos fotosintéticos en *Chlorella sp.* Cuantificados en $\mu\text{g/ml}$; presentados con barras que presentan la desviación estándar.

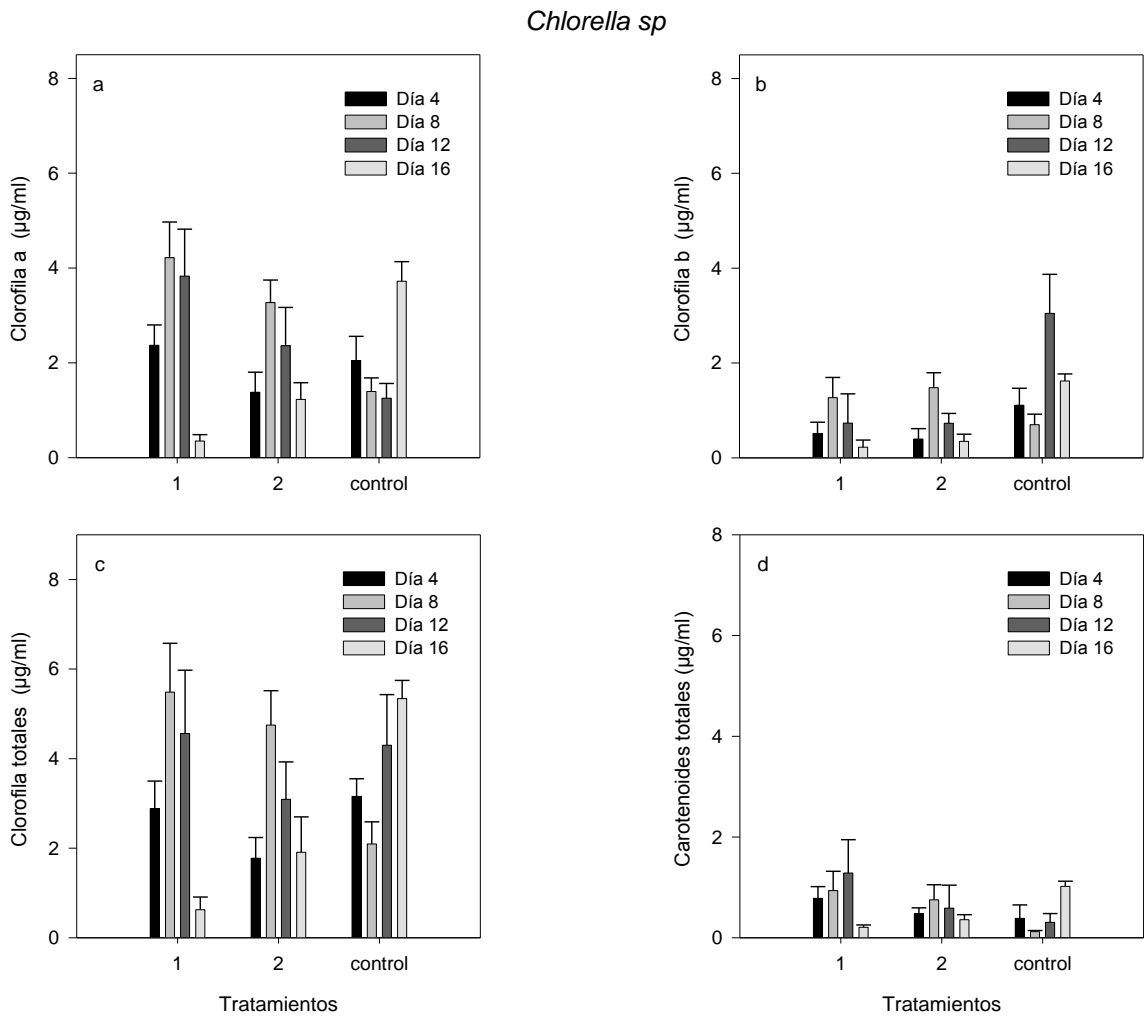


Tabla 9. Calidad promedio del medio de los diferentes parámetros analizados en el sistema de tratamiento desarrollado. Conductividad (CD), oxígeno disuelto (OD), salinidad (SAL), temperatura del agua (T. agua), temperatura del laboratorio (T. lab), humedad relativa (HR). Cantidad = medias + error estándar (Std Err).

Parámetros	Organismo							
	<i>Lemna minor</i>				<i>Chlorella sp</i>			
	T1	T2	C1	C2	T1	T2	C1	C2
pH	7,10±0,04	7,11±0,05	6,52±0,05	5,69±0,07	7,85±0,02	7,97±0,03	6,66±0,07	6,67±0,11
CD (mS)	0,39±0,00	0,38±0,00	0,17±0,00	0,58±0,01	0,94±0,20	0,96±0,20	0,16±0,00	0,56±0,04
OD (mg/l)	10,82±0,28	11,56±0,26	6,81±0,34	9,49±0,47	11,06±0,38	12,22±0,46	7,89±0,09	8,75±0,04
SAL (%)	0,02±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,03±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,03±0,00
T. agua (°C)	18,29±0,10	17,73±0,11	19,02±0,19	19,21±0,19	17,43±0,06	16,80±0,03	18,45±0,07	18,31±0,06
	Max		Min		Max		Min	
T. lab (°C)	21,06±0,45		17,39±0,09		19,06±0,25		17,26±0,02	
HR (%)	83,81±0,65		62,87±1,01		86,56±0,54		68,06±0,63	

4. DISCUSIÓN

El abordaje y estudio de los mecanismos de respuesta de las plantas al Mn, está poco estudiado; la mayoría de estudios disponibles corresponden a plantas superiores de importancia económica [20, 36]. La información disponible sobre el tema en macrófitas es escasa, y aún más para microalgas.

4.1 CINÉTICA DE ELIMINACIÓN, ADSORCIÓN, DE ACUMULACIÓN INTRACELULAR Y EFICIENCIA EN LA BIORREMOCIÓN DEL MANGANESO

L. minor, remueve Mn^{2+} a una velocidad mayor en el T1 (0,0658 $mg\ d^{-1}$) (K días), siendo esta velocidad mayor que la del T2 (Tabla 8; Figura 2a; 3a). Hurd y Sternberg [55], reportaron una velocidad de eliminación de 0,1791 por día, de Pb en *L. minor*. Las menores velocidades de eliminación de nuestro trabajo, habrían sido el resultado del contenido multi-metal del agua residual tratada; lo cual alteraría y limitaría la remoción del Mn^{2+} . La presencia de ciertos metales en el agua, pueden afectar el consumo de otros [45,112]. Los resultados de la cinética de eliminación, corresponden con la mayor eficiencia de biorremoción en T1 (Figura 2a; 3a).

La cinética de adsorción mostró coeficientes de determinación (R^2) bajos para el T1, debido a que, en el transcurso de los 16 días, la cantidad de Mn^{2+} adsorbido a la superficie de planta (q) tuvo fases crecientes y decrecientes; de esta manera se ve reflejado en los coeficientes de velocidad (k), donde se observa con claridad que la velocidad de adsorción fue mayor en el T2 (0,180 k); resultado que es confirmado, en la eficiencia de bioadsorción evaluada para dicho tratamiento (Tabla 8; Figura 2b). Una probable explicación a este resultado, fue que en el T2,

el medio fue esterilizado, mientras que en el T1 no; en el T1, la presencia de otros microorganismos pudo interferir en la capacidad de adsorción de *L. minor*. Los resultados de la cinética de acumulación intracelular en el T1, evaluados a partir del valor de la constante V_{\max} (mg/g d^{-1}), indicaron que *L. minor* pudo acumular 0.597 mg/g de Mn^{2+} por día. Sánchez- Galván et al. (2008), reportaron valores de V_{\max} ($\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$) para el Pb, en *Salvinia minima*, de 1,47 en agua sintética, y de 2,01 en agua desionizada, valores muy superiores a los nuestros. Las diferencias son propias, de ser valoradas en organismos distintos, para metales distintos, y a partir de medios líquidos diferentes; en el caso de Sánchez-Galván, un medio sintético enriquecido con Pb, y en nuestro caso, agua residual con múltiples variables y contaminantes.

Chlorella sp, mostró las mayores velocidades de eliminación y adsorción del Mn^{2+} , en el T2. Con la excepción de la velocidad de adsorción en el cual se insinúa una mayor velocidad en el T1 ($0,1172 \text{ g/mg d}^{-1}$) (Tabla 8); sin embargo, el ajuste del modelo no fue el mejor, debido a que nuestro trabajo y la estimación de la cinética se realizó a partir de la evaluación de la bioadsorción que realizó *Chlorella sp*, a lo largo de 16 días; por lo tanto, durante este lapso de tiempo, asociado al ciclo de vida de la microalga, se presentaron picos de incremento y descenso en su población y biomasa; por lo tanto, los resultados no son confiables. Los resultados evaluados a partir del ANOVA para el FAD, señalan ausencia de diferencias significativas ($p > 0,05$). La mayor velocidad de eliminación y de acumulación intracelular, en el T2; se habrían logrado, a causa de la ausencia de competencia con otros microorganismos; caso contrario al del T1, en el cual se probaron significativas remociones del Mn^{2+} , bajo competencia con múltiples organismos, ya que dicho medio no fue esterilizado. Aun, con velocidades menores, el T1 logró una significativa biorremoción del Mn^{2+} (Tabla 8; Figura 4a, b, c, d).

Miretzky et al. [82], evaluaron una alta capacidad de bioadsorción, por parte de tres macrófitas flotantes (*Pista stratiotes*, *Spirodela intermedia* y *Lemna minor*), en

su capacidad de eliminación simultánea de varios metales pesados (Fe, Cu, Zn, Mn, Cr y Pb), a partir de 15 días de tiempo de exposición, a escala de laboratorio. Bajo concentraciones de 1 mg/l^{-1} de Mn, *S. intermedia* removi6 un 96,91%, *L. minor*, un 95,20%, y *P. stratiote*, el 97,56%; a concentraciones de 2 mg/l^{-1} , *P. stratiote*, removi6 un 98,45%, y del 86,81% bajo 4 mg/l^{-1} . Nuestros resultados, corresponden con los resultados anteriores, evaluados bajo una concentraci6n de 1 mg/l^{-1} de Mn^{2+} , evaluamos una remoci6n del 66,47 % en un agua residual sin esterilizar (T1), el porcentaje es menor a lo reportado por Miretzky y colaboradores, pero basado en que se utiliz6 un agua residual industrial, los resultados son positivos.

Lizieri et al. [73]; evaluaron una significativa capacidad de remoci6n de Mn, a partir de la acumulaci6n del mismo en el tejido vegetal y a partir de la adsorci6n, en tres macr6fitas acu6ticas, *Azolla caroliniana*, *Salvinia minima* y *Spirodela polyrhiza*, a partir de concentraciones excesivas de Mn (0.05; 0.1; 0.2; 0,3; 0.4 mM). *S. polyrhiza*, acumul6 en sus tejidos una muy elevada concentraci6n de Mn ($17,062 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$), *S. minima* ($4,283 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$), y *A. caroliniana* un ($1,341 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$). Acumulaciones de Mn, muy superiores a la cuantificaci6n evaluada en nuestros resultados; sin embargo, hay que recordar que la c_i con la cual trabajamos en nuestro proyecto, correspondi6 a una concentraci6n real del Mn, hallada en una muestra de agua residual, siendo as6, y conociendo que dicho valor fue inferior al cual trabajaron Lizieri y colaboradores, es probable que *L. minor* alcance mayores concentraciones de remoci6n del Mn, bajo una exposici6n a mayores concentraciones del Mn; esto lo sealamos, ya que bajo la concentraci6n valorada, no se evalu6 ning6n indicio de estr6s, toxicidad o limitaci6n en su crecimiento. Esta capacidad l6mite de remoci6n deber6 ser explorada a futuro. Acorde a ello, Doganlar et al. [28], reportaron, la significativa capacidad de la macr6fita *Lemna gibba*, en la capacidad de remover Mn. Mediante monitoreos realizados los d6as 24, 48 y 72, bajo concentraciones de 0,25 mg/l, 1 mg/l, 4 mg/l, y 16 mg/l, de Mn, encontraron un incremento en la biorremoci6n al incrementar la

concentración del metal en el medio, con una concentración de 15,150 mg g⁻¹ peso seco, luego de 48 h, y de 16 mg g⁻¹ peso seco, luego de 72 horas.

La mayor capacidad de remoción del Mn²⁺, fue evaluada en el T1, con agua residual sin esterilizar; aun así, con interacción y probable competencia con microorganismos hallados en el medio, *L. minor*, fue significativamente tolerante y pudo remover un 66,47 % de Mn²⁺; tal capacidad se evaluó a partir de una significativa remoción a través de bioadsorción y bioabsorción; en general, el principal mecanismo evaluado en los dos tratamientos, fue la remoción a través de bioadsorción; el mecanismo que predominó en el T2 fue su significativa capacidad de bioadsorción (Tabla 4, 5; Figura 2a, b, c, d). *A. caroliniana* y *S. minima*, toleran concentraciones elevadas de Mn, pero sin embargo, no son eficientes en la acumulación y remoción de altas concentraciones del metal en sus tejidos, caso contrario a *S. polirhiza*, la cual probó ser altamente tolerante al incremento en la concentración del Mn, y en la acumulación y remoción del mismo [73]. Las principales características requeridas para determinar el uso de una planta en fitorremediación, está dado, por su capacidad de bioacumulación de contaminantes, asociada a una alta productividad de biomasa vegetal [119]. Por lo tanto, la capacidad que pueda poseer una planta o alga para responder a un contaminante como el Mn, lo favorece la capacidad dual, de tolerarlo y removerlo; siendo así, nuestros resultados, con una concentración inicial significativamente alta (1,14 mg l⁻¹ Mn²⁺), y una capacidad significativa en su biorremoción por absorción y adsorción, nos permite señalar que *L. minor*, es un sujeto prometedor y debe ser evaluado a más detalle en su potencialidad de remoción del Mn²⁺.

Nuestros resultados evaluaron que *L. minor* y *Chlorella sp*, pueden emplear eficientemente la absorción y la adsorción, alterando la utilización del tipo de mecanismo en el tiempo (Figura 2a, b; 4a, b). Mane y Bhosle [77], pudieron probar, a partir de siete días de exposición, un alto porcentaje de biorremoción, de Mn, por parte de las microalgas *Spirogyra sp* y *Spirulina sp*. Evaluaron un

incremento en la biorremoción del Mn, con el incremento de la concentración en el medio (5 – 25 mg/l), y pudieron establecer una biorremoción del 99,6% por parte de *Spirogyra sp*, y del 99,73% con *Spirulina sp*, bajo una concentración inicial de 5 mg/l. Wang et al. [120]; a partir del tratamiento terciario de diferentes aguas residuales municipales, evaluaron remociones eficientes de diferentes iones metálicos como Al, Ca, Fe, Mg y para nuestro interés del Mn, mediante el uso de *Chlorella sp*. *Chlorella sp*, removido 100% del Mn en tres de las cuatro fuentes de aguas residuales, a partir de concentraciones iniciales del 0,295±0,003; 0,308±0,002; 0,008±0,001, y del 98,2%, en la cuarta, bajo una concentración inicial de 2,797±0,016; resultados obtenidos a partir de nueve días. Nuestros resultados, fueron mucho menores a dichos valores, pero significativos en nuestra investigación, en la capacidad de remoción del Mn²⁺. *Chlorella sp*, fue expuesta a una concentración muy baja de Mn²⁺, debido a que el efluente que trató, fue el medio que salió de los reactores con *L. minor*, posterior a la remoción del Mn²⁺, por parte de la lenteja de agua, la cual removió un 66,47 (T1) y 46,90% (T2). *Chlorella sp*, logro una remoción del 29,89% en el T1, y del 66,29% en el T2 (Tabla 5). Dichos resultados, son el producto de una baja concentración del Mn²⁺ en el medio, así, como de los nutrientes (no fue evaluado) en el medio, luego de 16 días de remoción de *L. minor*, probablemente bajo una concentración mayor del Mn²⁺ y nutrientes, se habría incrementado la eficiencia de biorremoción.

4.2 FACTOR DE ACUMULACIÓN INTRACELULAR (FAI), FACTOR DE ADSORCIÓN (FAD) Y FACTOR DE BIOCONCENTRACIÓN (FBC), POR PARTE DE *L. minor* Y *Chlorella sp*

El factor de bioconcentración (FBC) han sido usados para evaluar la capacidad para acumular contaminantes en diversidad de organismos (vertebrados, plantas y microorganismos) [34, Burton *et al.*, 2006). Baker y Brooks [7], propusieron que

una planta terrestre sería considerada hiperacumuladora al contener >0.1% de su peso seco del metal, en el caso del Pb. Zayed et al. [124], propuso por primera vez un valor >1000 para definir a una planta acuática como hiperacumuladora de metales, a partir de su FBC. El término “hiperacumulador” fue acuñado por Brooks y Reeves, para referirse a plantas capaces de acumular >1.000 mg Ni kg⁻¹ de materia seca en algún tejido de su biomasa aérea [18]. Los organismos hiperacumuladores, pueden tolerar, absorber y translocar altos niveles de ciertos metales pesados que serían tóxicos para la mayoría de los organismos. Actualmente se utiliza el término hiperacumuladora de metales para designar plantas que acumulan >10.000 mg kg⁻¹ de Mn y Zn, >1.000 mg kg⁻¹ de Co, Cu, Pb, Ni, As y Se y >100 mg kg⁻¹ de Cd [63]. Comparativamente, los FBC evaluados a partir de *L. minor*, presentaron valores > 1000. Dicha cuantificación permite afirmar que *L. minor* presentó una gran capacidad para hiperacumular Mn²⁺, bajo la concentración inicial en evaluación y bajo los parámetros y condiciones de nuestro experimento (Tabla 7). El FBC fluctuó en el tiempo, sin un patrón establecido.

Branković et al. [13], bajo una concentración inicial de 0,315±0251 (mg l⁻¹) de Mn en el agua, evaluaron factores de bioconcentración de 160,256 para *Alisma plantago-aquatica*, 3849,283 para *Mentha aquatica*, 2101,330 en *Myriophyllum spicatum*, 923,343 en *Bidens tripartitus*, 1427,45 en *Polygonum amphibium*, 1515,45 en *Lycopus europaeus*, 6382,28 en *Typha angustifolia*, 2286,59 y de *Roripa amphibian*. A partir de dichos resultados, es claro que las plantas presentan diferentes capacidades para remover Mn y otros metales. Nuestros resultados, probaron mayores FBC en la capacidad de remoción de *L. minor*, y bajo una mayor concentración inicial de Mn²⁺ en el medio (1,14 mg l⁻¹), por lo tanto, *L. minor* presenta un gran potencial de remoción y tolerancia al Mn²⁺ (Tabla 7; Figura 2c, d). La reducción evaluada en el FBC con el incremento del tiempo de exposición lo relacionamos a la reducción en la concentración del Mn²⁺ en el agua.

Sekabira et al. [107], a través del estudio de biomas de algas, a partir del monitoreo en diferentes puntos de muestreos in situ, en localidades con concentraciones de 535 ($\mu\text{g/l}$), 685 ($\mu\text{g/l}$), 610 ($\mu\text{g/l}$), 1915 ($\mu\text{g/l}$), 155 ($\mu\text{g/l}$), 475 ($\mu\text{g/l}$), 475 ($\mu\text{g/l}$), 755 ($\mu\text{g/l}$), evaluaron FBC's correspondientes a 2004.21, 1293.87, 1693.04, 436.15, 46669.61, 1503.31, 2239.83, 2213.23, respectivamente. Comparativamente, los resultados del FBC en *Chlorella sp*, fueron < 1000 . Logrando una mayor cuantía el día 12 con un FBC de $889,841 \pm 126,78$, el FBC incremento en el tiempo. El T2 presentó, su mayor FBC, el día 12 ($969,280 \pm 92,90$). Posterior a esta fecha (día 16), declinaron los valores para los dos tratamientos; dicha caída en el FBC, pudo ser producto de un momento en el cual había mucha biomasa, para muy poco Mn por remover; bajo una concentración inicial mayor, *Chlorella sp*, pudo lograr valores de FBC > 1000 ; a pesar de ello el día 12, estuvo prácticamente en dicho umbral (Tabla 5, 7; Figura 4c, d).

El FBC, propuesto por Zayed et al. [124], es un índice muy útil para la estimación de la capacidad de biorremover metales pesados por diferentes organismo; sin embargo, dicho índice no diferencia entre la capacidad de adsorber el metal en la superficie de la planta y entre la habilidad de acumular el metal intracelularmente (bioabsorción). Con la finalidad de realizar un estudio a mayor detalle y poder cuantificar la capacidad de absorción y adsorción, Sánchez-Galván et al. [105], propusieron calcular el "factor de acumulación intracelular (FAI), y el factor de adsorción (FAD)". El uso de dichos índices, permitió evaluar una clara capacidad de hiperacumular Pb, por parte de *Salvinia minima*, principalmente a partir de adsorción, evaluado a partir de un FAD (780 – 1980), capacidad relacionada muy seguramente un gran área de superficie ($264 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) y a un alto contenido de grupos carboxilo en su pared celular [105].

La cuantificación del FAD y FAI, nos permitió establecer, que *L. minor*, habría hiperacumulado Mn^{2+} , y cuyo mecanismo principal y dominante, fue su alta

capacidad de bioadsorber Mn^{2+} , y corroborado a partir de valores de FAD > 1000, valores que fluctuaron a lo largo del tiempo de exposición (Tabla 7; Figura 2c, d). El FAD, fue significativamente mayor ($p. < 0,05$) en el T2 (Tabla 7; Figura 2c, d). El FAD, fue mayor en el T2 durante los días 4, 8 y 12 de exposición, pero declinó el día 16, contrastando con un incremento del FAI para dicho día (Tabla 7; Figura 2c). Tal capacidad de bioadsorción, evaluada a través de la eficiencia (%) de bioadsorción y del FAD, estuvo correlacionado positivamente con el AF, como lo discutiremos más adelante, bajo una mayor área foliar, se estimula una mayor eficiencia de bioadsorción y FAD (Figura 5a). Dichos resultados, son afines a los reportados con anterioridad, por Sánchez-Galvan et al. (2008), en la remoción de Pb, utilizando *S. minima*. *L. minor*, presentó los mayores FAI en el T1, pero entre este y el FAD, fue mayor el FAD.

Los resultados de la cinética de adsorción para *L. minor*, corresponden y se ven reflejados en los mayores valores del FAD y FBC, en el T2 (Tabla 7; Figura 2d). Los resultados de la cinética de acumulación intracelular, son afines a los valores evaluados en el FAI, y en el porcentaje de eficiencia de bioadsorción, en el T1, para *L. minor* (Tabla 8; Figuras 2a, c). Los resultados evaluados en *L. minor*, establecieron que en el T1 se logró la mayor eficiencia en la remoción del Mn^{2+} , y los resultados de la cinética de eliminación así lo soportan; a pesar de ello, la cuantificación del FBC estableció al T2, como el medio en el cual se evaluó la mayor capacidad de biorremoción por parte de *L. minor*. Dicho resultado en el FBC y producto de la relación entre la biomasa y la concentración de Mn^{2+} removido, fue producto de la importante remoción del Mn^{2+} realizada por bioadsorción en el T2, significativamente mayores que las evaluadas en el T1, patrón que se puede corroborar a partir de los resultados de las eficiencias de remoción y a partir de la cuantificación realizada con el FAD, con un pico máximo evaluado el día 12 del experimento (Figura 2b, d; 3a). Tal FBC para el T2, pudo ser favorecido, por la ausencia de competencia con otros microorganismos, ya que dicho medio fue esterilizado previamente al experimento; el T2, presentó > FBC

que el T1, pero con una velocidad de eliminación más lenta. El T1, presionado por la competencia habría incrementado la velocidad del consumo del Mn^{2+} .

Chlorella sp, presento valores < 1000 en la cuantificación del FAD y FAI; el T1 presentó cuantitativamente los mayores FAI, siendo este el principal mecanismo evaluado para *Chlorella sp*, con valores que oscilaron entre $239,905 \pm 17,2$ - $361,468 \pm 50,1$ (Tabla 7). La mayor velocidad de bioabsorción, evaluada para el T1, coinciden con los resultados altamente significativos ($p. < 0,001$), evaluados en la eficiencia de bioabsorción de *Chlorella sp*, y la cuantificación del FAI y FBC, evaluadas durante el día 4, para el T1; todos estos resultados sustentan, que el principal mecanismo de biorremoción desplegado por *Chlorella sp*, fue su significativa bioabsorción (Tabla 7, 8; Figura 4a, b, c, d). Los valores del FAD, fueron similares en los dos tratamientos, pero, difieren en la interacción en el tiempo (Figura 4c, d). Debido a que este es un trabajo pionero en la utilización de los índices FAI y FAD en microalgas, y a la ausencia de literatura, en la cual se aborde la biorremoción del Mn^{2+} , mediante la cuantificación del FAD y FAI, no permite discutir los resultados, impidiendo establecer si los valores aparentemente bajos del FAD y FAI, son bajos o altos, en comparación a la tolerancia del organismo al Mn^{2+} . Asociado al tema, se ha evaluado que en el contenido celular de *Scenedesmus subspicacatus*, una dominancia en el mecanismo de absorción intracelular de Mn, a bajas concentraciones del mismo [64]. Aun cuando en *Chlorella sp*, se evaluó una mayor eficiencia de biorremoción del Mn en el T2, los mayores FBC y por lo tanto, el tratamiento en el cual se evaluó la mayor capacidad de biorremoción fue el T1; dichos resultados contradictorios, nos permiten, evaluar que al estudiar la biorremoción basados sólo en porcentajes de remoción, podríamos obtener un resultado, que no siempre va a ser confiable, ya que no se toma en cuenta, la cantidad de biomasa que generó dicha remoción; siendo así, los resultados del FBC, por lo tanto, indicaron que el T2, logró una significativa capacidad de biorremoción, pero con una mayor biomasa de la microalga; por el contrario, en el T1, con una menor biomasa se obtuvo la mayor

capacidad de biorremoción del Mn^{2+} (Figura 3b; 4c, d; 5b; 8). De ser requerido, *Chlorella sp.*, debería ser cosechada durante el día 12, debido a que posterior a dicha fecha, FAI, FAD y FBC se reducen significativamente (Figura c, d). De igual manera *L. minor*, debería ser cosechada, luego de 12 días de exposición al Mn^{2+} (Figura 2a, b, c, d).

4.3 EFECTO DEL TAMAÑO DEL BIOABSORBENTE Y DE LA DENSIDAD CELULAR

Igwe y Abia [56], referencian el efecto que generan los diferentes tamaños de los adsorbentes empleados en la capacidad de adsorción. Siendo así, un área superficial grande proporcionaría una gran capacidad de adsorción [85]. Dicho patrón de respuesta fue evaluado en los resultados del experimento con *L. minor*, principalmente en el T1, a partir de la eficiencia de bioadsorción, FAD y AF; y reafirmado con la correlación positiva, evaluada entre el AF y la eficiencia de bioadsorción (%bioadsorción), y en la cual, una mayor AF favorece una mayor tasa de bioadsorción (Figura 2a, b, d; 5a; 8a).

Nuestros resultados demuestran, que la concentración del alga evaluada a partir de su densidad celular, afectan la cantidad de metal que se puede remover del medio. Las mayores eficiencias de bioadsorción y bioadsorción evaluadas durante los primeros cuatro días del experimento con *Chlorella sp.*, y su gradual reducción con el incremento del tiempo de exposición, coinciden con el trabajo de Fourest y Roux [37], realizado con micelio de *Rhizopus arrhizus*, y a partir del cual le atribuyen la responsabilidad del decrecimiento en la remoción del metal, a la reducción de la concentración del metal en la solución. Tam et al. [115], reportaron mayor remoción de cobre (Cu), con menores densidades de *C. vulgaris*, y un decrecimiento significativo en la remoción al incrementar la densidad del inóculo. Así mismo, encontraron que la cantidad de Cu adsorbido y absorbido

por la biomasa de *C. vulgaris*, durante las cuatro horas de reacción, decreció con el incremento de la densidad de la biomasa. Nuestros resultados son consistentes con dicha respuesta, para el T1, probablemente asociado a la reducción limitante en la concentración de Mn^{2+} en el medio. Es así, que se ha propuesto que puede haber un límite superior en la concentración de Mn^{2+} , debido a que la concentración inicial del Mn^{2+} en el medio, decrece con el crecimiento de las algas [64]. Basado en ello, la concentración inicial inoculada de *Chlorella sp*, en nuestro trabajo, fue significativamente eficiente en su capacidad de biorremoción del Mn; el T1 presentó de manera significativa dicho patrón, y redujo su RGR, mientras que el T2, presentó una RGR constante en el tiempo, e igualmente, presentó una menor disponibilidad de Mn^{2+} en el tiempo (Figura 4a, b; 7d). De igual manera, dicho patrón de respuesta, se evaluó positivamente, en la correlación negativa establecida a partir de la prueba de Pearson, entre la densidad celular y la eficiencia de bioabsorción; en la cual, y principalmente en el T1, con las menores densidades celulares, se presentaron las mayores tasas de bioabsorción, y una reducción significativa con el incremento en la densidad celular logrado posteriormente en el tiempo (Figura 5b).

Aksu y Kutsal [3], evaluaron este mismo patrón y concluyeron que debido a la agregación de las células, producto del incremento en la densidad celular, se afectaría la capacidad de remoción al reducir el área efectiva para la adsorción. Dönmez et al. [29], en su trabajo con *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y *Synechocystis sp*, hallaron que al incrementarse la densidad celular, se puede incrementar la remoción del ion metálico, pero decrecería la capacidad de equilibrio ($q_{eq} = \text{mg del ion metálico removido g}^{-1}$ del alga). A concentraciones más altas, efectivamente la agregación celular, reduciría el área efectiva de adsorción. Sin embargo, bajo altas concentraciones de biomasa, se evaluó una rápida adsorción, producida cuando las concentraciones del metal son bajas, que cuando la concentración celular es baja. *C. vulgaris*, incrementó la adsorción de Cu^{2+} y Ni^{2+} , al incrementar su biomasa, a un mayor grado que, *Scenedesmus. obliquus* y

Synechocystis sp. Este último patrón de respuesta, corresponde con los resultados evaluados en *Chlorella sp.*, en el T2, en el cual, la mayor eficiencia de biorremoción se produjo entre los días 12 y 16, etapa en la cual la concentración del Mn^{2+} en el medio fue baja, y coincidió con un momento en el cual la microalga, lograba un incremento en su densidad celular significativo respecto al T1, una gran densidad de biomas, en un momento con muy poco Mn^{2+} , pudo estimular una rápida y significativa adsorción del Mn^{2+} del medio; dicho patrón puede verse durante el día 12 en la eficiencia de adsorción y en la magnitud del FAD (Figura 4 b, d; 8b, d).

El principal mecanismos de biorremoción evaluado en nuestro trabajo en *Chlorella sp.*, fue su significativa bioabsorción, y esta se reduce con el incremento de la densidad celular, significativamente en el T1 (Figura 5b). Sin embargo, el patrón de respuesta de *Chlorella sp.* en el T2, es contrario al del T1, logrando las mayores y significativas eficiencias de remoción del Mn^{2+} , a mayores tiempos de exposición y mayores densidades celulares. Es probable que un factor asociado a dicho patrón de respuesta sea la competencia interespecífica. En el T1, el medio no fue esterilizado, por lo tanto, la microalga, creció en un medio que compartía con otros microorganismos (Navículas, bacterias, protozoos como *Vorticella sp.*, *Paramecium sp.*, y organismos como los gastrotricos, entre otros), a diferencia del T2, en el cual el agua fue esterilizada y se presentó ausencia de competencia. La competencia interespecífica, por la depredación y por los nutrientes, y en ellos el Mn^{2+} , pudo ser un factor adicional estimulante en el incremento de la eficiencia y capacidad de consumo del Mn^{2+} , asociado a un elevadas tasas de crecimiento en el T1, durante los primeros días de exposición al medio; y por lo contrario, para el T2, con ausencia de competencia, los nutrientes, como el Mn^{2+} , pudo adsorberse y absorberse en menores porcentajes a lo largo del experimento, pero durante los días 12 y 16, debido al incremento significativo en la densidad celular, pudo alcanzar las mayores eficiencias en la biorremoción (Figura 4a, b, 8b, d). Este tipo de mecanismos estimuladores de un mayor consumo de un nutriente dado, se ha

evaluado en el consumo de nitrógeno, entre el *Halimeda incrassata* y el pasto marino, *Thalassia testudinum*, bajo competencia interespecífica [14].

4.4 APROXIMACIÓN AL MECANISMO DE BIORREMOCIÓN

L. minor y otras macrófitas como *L. gibba*, emplean como principal mecanismo de remoción, la rizofiltración, mecanismo a través del cual, la planta en suspensión, emplea su raíz para remover sustancias tóxicas y el exceso de nutriente, mediante la absorción y adsorción de los mismos [52]. La adsorción a la superficie de las raíces o de la planta, la translocación y la acumulación intracelular han sido descritos como los principales mecanismos bajo el sistema de macrófitas flotantes [95]. El estudio de biorremoción del plomo (Pb^{2+}), en comparación al Mn, está ampliamente descrito; es así, que se ha reportado, que en las plantas vasculares, se adsorbe y acumula el Pb^{2+} principalmente en la raíces y del cual sólo una pequeña parte es translocada a la parte aérea [96]. Se ha reportado que la mayor parte del Pb^{2+} biorremovido a partir del medio, por *Eicchornia crassipes* (57 – 77,5%), quedó en sus raíces [93]. Los resultados evaluados en nuestro trabajo en *L. minor*, corresponden con el mecanismo reseñado con anterioridad para *Eicchornia crassipes*, hallando a la alta capacidad de bioadsorción de Mn^{2+} , como el principal mecanismo empleado para biorremover el metal a partir del medio. Es necesario realizar el estudios de compartimentalización, a partir de los cuales, se discrimine, y cuantifique la capacidad de biorremover Mn^{2+} , tanto por la raíz, como por el cuerpo de la planta. Evaluando la capacidad de alterar la eficiencia del mecanismo de adsorción y absorción del Mn^{2+} . Es así, que evaluamos en el T1, la inversión en la potencialidad de dichos mecanismos en el tiempo (día 16), mayor eficiencia de bioadsorción (días 4 – 12), y mayor eficiencia de bioabsorción (día 16) (Figura 2a).

Las microalgas han demostrado tener una gran capacidad de unión a metales pesados [87], debido a la presencia de polisacáridos, proteínas y / o lípidos en la superficie de sus paredes celulares, los cuales contienen grupos funcionales cargados (*ejemplo*: amino, hidroxilo, carboxilo y sulfato) que puede atraer, y por lo tanto actuar como sitios de unión para los metales [8, 43]. Las interacciones competitivas entre los nutrientes y los metales inhibidores, ha sido evaluado en gran variedad de algas. De tal manera, que la presencia de ciertos metales en el agua, puede afectar el consumo de otros; es así, que en el consumo de manganeso, se ha demostrado que se puede unir y transportar a un número de metales químicamente similares, incluyendo al cadmio, y posiblemente al zinc y al cobre [45, 112]. Se ha evaluado la existencia de unión competitiva entre el cadmio y el manganeso en *Chlorella pyrenoidosa* [112] y entre el zinc y el manganeso en *Chlamydomonas* [113]. A partir de esto, una causa adicional y no evaluada, de la limitada remoción del Mn^{2+} por parte de *Chlorella sp*, pudo ser la presencia de otros metales pesados, lo cual pudo interferir en alguna medida en su capacidad de adsorción y absorción del Mn^{2+} ; las muestras de aguas residuales a partir de las cuales se desarrolló el proyecto, corresponden al efluente de una central térmica, y dichas aguas se caracterizan por la presencia de múltiples metales. En estudios y caracterizaciones del efluente del cual provinieron las muestras, se ha evaluado la presencia de Fe, Zn, B, Cd y Hg, acompañando al Mn.

Los sitios de unión y coordinación de las proteínas de transporte, no son del todo específicos para los metales nutritivos (Mn, Fe, Zn, Co, Cu, Mo, Mg), y por lo tanto, se pueden unir y transportar metales no nutritivos o tóxicos. La competencia por los sitios de transporte de membrana y por los sitios de unión metabólicos intracelulares, puede influir sustancialmente en la absorción tanto de metales tóxicos, como de metales nutritivos, reduciendo las tasas de captación del metal nutritivo y afectando el crecimiento de la microalga [113]. Las células regulan la tasa de absorción de metales nutrientes para mantener sus concentraciones intracelulares en los niveles óptimos necesarios para el

crecimiento y metabolismo [111]. Así mismo, los iones divalentes Mg^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} , pueden reducir, e inhibir el transporte de Mn^{2+} hacia el interior de las microalgas, al establecer competencia por los sitios de unión disponibles (proteínas de membrana) para su transporte. Dicho evento, indica que el Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} y el Cd^{2+} , pueden entrar a las células empleando un sistema de rutas comunes, con diferentes afinidades para cada metal [39]. Hart *et al.* [45] describieron la competencia entre Mn^{2+} y Cd^{2+} para un sistema de captación común en *Chlorella pyrenoidosa*; y en el cual se tiene una afinidad diez veces inferior para el Mn^{2+} . La competencia entre Zn^{2+} y Cd^{2+} para un sistema de captación común también se ha descrito en *C. fusca* [78] y *C. vulgaris* [117]. Las interacciones de competencia entre los metales de nutrientes e inhibidores son comunes y se han identificado en el fitoplancton entre Mn y Cu, Mn y Zn, Mn y Cd; Zn y Cu [103, 114].

Chlorella sp., potenció como principal mecanismos de remoción su significativa capacidad de bioabsorción del Mn^{2+} . Mecanismo correlacionado negativamente con la densidad celular (Figura 8b). *Chlorella sp.*, presentó una alta capacidad de biorremover Mn^{2+} mediante absorción de Mn^{2+} . Al parecer, a mayores concentraciones en la disponibilidad de Mn^{2+} , *Chlorella* potencia su capacidad de absorber y acumular dicho micronutriente, empleándolo para sus procesos metabólicos, y al reducirse la concentración del metal en el medio, en el tiempo, iguala los dos mecanismos (absorción y adsorción) (Figura 8b; d; 9). Mecanismo que relacionamos a las mayores RGR evaluadas durante los primeros días, las cuales declinan en el tiempo (Figura 8d).

4.5 MANGANESO Y SU EFECTO EN LOS PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS Y CRECIMIENTO DE *L. minor* Y *Chlorella sp*

Lizieri et al. [73], evaluaron una reducción significativa en el contenido de clorofilas totales en *Azolla caroliniana*, *Salvinia minima* y *Spirodela polyrhiza*, a partir de concentraciones excesivas de Mn (0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 mM), así, como una reducción en el contenido de carotenoides en *A. caroliniana*. (27,02 %) y *S. polyrhiza* (25,34 %). *S. polyrhiza* redujo su crecimiento en un 21,34%. Dicha reducción de pigmentos fotosintéticos a exposiciones excesivas de Mn^{2+} , ha sido evaluado de igual manera en plantas terrestres como *Pisum sativum* (Gangwar et al, 2010), *Hordeum vulgare* [27], *Glycine max* (Wu, 1994) y *Phaseolus vulgaris* (González et al., 1998). El exceso de Mn^{2+} , puede causar deficiencias de hierro y magnesio, debido a la entrada dentro de las porfirinas, en lugar del hierro y magnesio [108]. La fitotoxicidad generada a partir de excesos de Mn^{2+} , se manifiestan en la reducción de biomasa y de la fotosíntesis, así, como con desordenes tales como el estrés oxidativo [80]. Nuestros resultados, por lo contrario, evidenciaron un incremento significativo en la concentración de clorofila a, b, clorofilas totales, carotenoides, y en crecimiento de *L. minor*, con el incremento del tiempo de exposición y bajo la concentración de Mn^{2+} evaluada. Doganlar et al. [28], reportaron para *Lemna gibba*, una respuesta similar a la nuestra, con un incremento en la clorofila total y en el contenido de carotenos, a bajas concentraciones de Mn. El Mn^{2+} es un importante microelemento, y está presente como componente de enzimas y como cofactor enzimático. El incremento en el contenido de pigmentos, en plantas expuestas a niveles bajos de Mn^{2+} , puede atribuirse a que el Mn^{2+} juega un importante papel como precursor en la síntesis de clorofilas [101], y por lo tanto, promotor de un crecimiento positivo de plantas y algas, tal como pudimos evaluar en el experimento con *L. minor* y *Chlorella sp.*

El metabolismo del Mn^{2+} en las microalgas es similar al de las macrófitas. Desde hace décadas se ha corroborado la influencia que tiene el Mn^{2+} en la fotosíntesis de las algas como *Chlorella*, y en el cual, a partir de la deficiencia de Mn^{2+} , se reducen las tasas fotosintéticas [62]. Knauer [65], señaló que el Mn^{2+} actúa como

un factor limitante del crecimiento dependiendo de la sensibilidad del alga a la concentración del Mn^{2+} , en los cuerpos de agua naturales. Bajo concentraciones elevadas de Mn^{2+} , se ha evaluado, reducción del volumen celular total, en *Chlorella stigmatophora* (50 mg/l, luego de 12 días) [25]. Se ha evaluó, inhibición del crecimiento de *Scenedesmus quadricaudata* (5 mg/l, luego de 12 días); y la reducción total de las clorofilas a 1,9 mg/l, luego de 12 días [33]. Nuestros resultados, permitieron establecer para *Chlorella*, que para los dos tratamientos, se incrementó la concentración de clorofila a, b, totales y carotenoides totales, durante los primeros ocho días de exposición al agua residual con Mn^{2+} , y redujeron gradualmente su concentración entre los días 12 y 16 (Figura 10a, b, c, d). Tal limitación en la concentración de los pigmentos fotosintéticos evaluados para los dos tratamientos en *Chlorella sp.*, lo atribuimos al déficit del Mn^{2+} en el medio para dichos días, lo cual habría limitado la síntesis de pigmentos. Knauer et al. [64], encontraron resultados similares en la limitación del crecimiento de *Scenedesmus subspicatus* a bajas concentraciones Mn^{2+} (cerca a 10×10^{-9} M), asociadas a una reducción de la concentración inicial de Mn^{2+} en el medio se redujo durante el crecimiento de las algas.

4.6 REMOCIÓN DE LOS SST Y RELACIÓN CON LA PRODUCTIVIDAD DE LA BIOMASA

Los sólidos suspendidos volátiles (SSV), representan la fracción orgánica de los sólidos SST; dicho parámetro se correlaciona directamente con la concentración de microorganismos en el agua, y se ha empleado para monitorear la biomasa de *C. vulgaris* de manera indirecta [76, 118]. En nuestro trabajo sustrajimos el peso evaluado de los SSV de los SST, para poder encontrar la real reducción de los SST asociados a la carga contaminante, a lo largo del tiempo.

Especies del género *Lemna*, se caracterizan por tener un rápido crecimiento, alta tolerancia a altas cargas orgánicas y a elevadas concentraciones de micronutrientes, por tener una alta capacidad de absorción, de consumo de minerales y nutrientes. En sistemas de tratamiento de aguas residuales la lenteja de agua, elimina por bioacumulación, hasta un 99% de los nutrientes y de sólidos disueltos; logrando reducir significativamente los SST y la DBO debido a la reducción en la luz solar en las lagunas [109]. Los elevados valores en la eliminación de nutrientes, son el resultado directo de su rápido crecimiento y de su elevado recambio [83]. Reeta et al. [100], evaluaron una significativa reducción en los SST, y en nutrientes, empleando la macrófita *Eichhornia crassipes* y la lechuga de agua (*Pistia stratiotes*). Asociado al proceso, evaluaron un incremento en los SST a partir del crecimiento de algas. Nuestros resultados corresponden con los resultados de estos trabajos, ya que evaluamos una alta remoción de los SST, a partir de *L. minor*. Bouali et al. [11], evaluaron una eficaz y positiva remoción de SST ($77,7 \pm 16,3\%$); remoción conjunta entre la lenteja de agua y microalgas, un proceso inicial con *L. minor*, continuado por la acción conjunta de tres microalgas, *Chlorella sp*, *Scenedesmus sp* y *Euglena sp*, mediante tratamiento terciario en aguas residuales *in situ*. Dichos resultados son totalmente afines a los nuestros, y evaluados en la significativa remoción de SST realizada por *L. minor*, a partir de la cual, removi6 en el T1 un $80,40 \pm 5,57\%$; y un $62,82 \pm 4,23\%$ en el T2, luego de 16 días de exposición. Dichos resultados corroboran que *L. minor* es una planta con una gran capacidad de remover SST, y asociado a ello nutrientes y en nuestro caso Mn^{2+} . *Chlorella sp*, incrementa su densidad con el incremento en el tiempo de exposición, y como era de esperar al no estar inmovilizada, como en el caso de Boali y colaboradores, incremento el valor de los SST, pero al sustraer los SSV, del valor de los SST, pudimos ver, que sí se realiza este tipo de sustracción del componente alga, podemos obtener un patr6n de reducci6n del componente contaminante que hace parte de los SST, encontrado así una remoci6n del 19,45% en el T1, y del 34,13% en el T2; Para una remoci6n conjunta y total del 99,85%

y del 96,95 % en los tratamientos 1 y 2 respectivamente. (Tabla 4; Figura 5a, b; 11).

L. minor, y otras macrófitas flotantes, disminuyen la producción de algas, ya que compiten eficientemente por los nutrientes y se extienden sobre toda la superficie del agua, restringiendo la penetración de la luz, y por lo tanto, limita la fotosíntesis de las microalgas [44]. Por lo tanto, a partir de dicho mecanismo, reduce el aporte biológico que las microalga generan en los SST, al crecer; por lo tanto, aun cuando se evaluó la presencia de microalgas en el medio durante el último día de muestreo (día 16) en el experimento con *L. minor*, el aporte en población de las microalgas fue mínimo, acorde a lo reseñado con anterioridad. No estando presente la macrófita en el control con agua residual y sin inóculo, permitió que prosperara una mayor población de *Chlorella sp* en el tiempo. *L. minor*, es un organismo altamente eficiente en la remoción de SST, así, mismo el estudio en *Chlorella sp*, permitió conocer el aporte que representan las microalgas en los SST, y cómo al sustraer dicha cuantía, permite conocer, su capacidad de remoción de los demás componentes de los SST (Figura 7).

Es importante reseñar, que el control con agua residual sin inóculo, no recibió medio nutritivo, por lo tanto, el crecimiento evaluado de *Chlorella* en el tiempo fue muy leve, probablemente, debido a la limitante nutricional. La remoción del 38,42% de Mn^{2+} y del 41,31% de SST, evaluada en el control, pudo estar relacionado a dicho medio sin inóculo, presentó una gradual contaminación por *Chlorella sp*, evaluada desde el día 16 del experimento con *L. minor*, y la cual se incrementó posteriormente al iniciar el experimento con *Chlorella sp*. Dicha población de microalga, se reprodujo levemente, y junto con los demás microorganismos en el medio, estimularon una remoción significativa, de Mn^{2+} , y en alguna medida de SST; dicho evento incidental, permite reafirmar la significativa capacidad de *Chlorella sp*, de remover eficientemente Mn^{2+} .

4.7 EFECTO DEL PH Y LA TEMPERATURA EN LA BIORREMOCIÓN DEL MN^{2+} Y DE LOS SST

El pH y la temperatura, no fueron variables ajustadas en nuestro experimento, por lo tanto, debido a que dentro de los propósitos de la investigación están los de conocer bajo un acercamiento a lo que puede ocurrir en campo abierto, en la fluctuación de dicha variables. La temperatura del laboratorio fue controlada, de tal manera que se asemejara a la condición natural a la temperatura de la región de la cual procedieron las muestras de agua residual (Tabla 2).

La temperatura tiene gran relevancia en el crecimiento celular y en la síntesis metabólica, es así, que se ha reportado para *Chlorella* una temperatura óptima para su crecimiento de 30 – 35°C [21]. A pesar de que las temperaturas en el medio fueron inferiores a dicho valor, *Chlorella sp*, creció sin evidenciar algún grado de inhibición (Tabla 2). Zimmo et al. [125], hallaron que los estanques con microalgas, los valores de pH fueron generalmente superior a 8,0, comparado con estanques con *Lemna*, en donde, el crecimiento de la lenteja de agua, impide significativamente la fotosíntesis de las algas, y como resultado presentaron valores más bajos de pH. Dichos hallazgos son afines con los resultados evaluados en los experimentos con *L. minor* y *Chlorella sp*; con valores de pH cercanos a 8 (T1: 7,85; T2: 7,97) en el experimento con *Chlorella sp*, y valores más bajos en *L. minor* (T1: 7,10; T2: 7,11) (Tabla 2). Los valores del pH y de temperaturas evaluados en el agua de los reactores para los dos tratamientos estuvieron dentro de los rangos de tolerancia para *L. minor*. *L. minor*, tiene una temperatura óptima en un rango de 18 – 24°C (ISO/WD 20079) [57], así, como de un pH de 5,6 – 7,5 [84] (Tabla 2).

4.8 REVISIÓN LITERARIA DE OPCIONES TECNOLÓGICAS PARA EL MANEJO DE LA BIOMASA RESIDUAL

La estimación del tiempo de cosecha y del manejo de la biomasa seleccionada para procesos de biorremoción de metales pesados, es trascendental para la rentabilidad y el establecimiento exitoso de proyectos de biorremediación de metales pesados in situ, y a gran escala. Debido a la gran cantidad de biomasa producida durante dichos procesos, se necesita de una eliminación y manejo adecuado de dicha biomasa [40].

Entre las limitaciones de los sistemas con macrófitas flotantes, se encuentra la capacidad limitada de acumular biomasa. Esto obliga a hacer retiros periódicos de dicha biomasa, para permitir el crecimiento de las plantas emergentes, y optimizar la captura de algunos componentes del agua residual [35]. En la literatura, se ha reportado el potencial uso de la biomasa residual de los procesos de biorremoción de metales pesados, en posibles usos que puedan proveer de algún tipo de recurso económico [46]. *Lemna minor*, por ejemplo, posee un gran potencial como recurso económico, ya que por su alta digestibilidad, es tan buena o mejor que el pasto para nutrición de animales. Además, su pequeño tamaño y su naturaleza flotante facilitan la cosecha, traduciéndose en bajos costos [79]. En la literatura se han señalado posibles usos para la biomasa, tales como la incorporación como fertilizante en la tierra o compost, la manufactura de cartón, la producción de combustibles, o también el uso como material absorbente de colorantes y metales pesados [24]. Martelo y Lara [79], reportaron, como el Jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*), puede ser sometido a digestión anaerobia, para así producir metano; posibilidad de compostaje, para una disposición posterior sobre el suelo; el secado al aire y la posterior disposición en un relleno sanitario; y de la incineración.

Algunos autores como Kumar *et al.* [69] y Garbisu y Alkorta [38], han propuesto al compostaje y a la compactación, como tratamientos para la biomasa post cosecha. Estudios llevados a cabo por Hetland *et al.* [48], mostraron que el compostaje puede reducir significativamente el volumen de la biomasa cosechada, sin embargo, dicha biomasa y el lixiviado, estarán contaminados por el metal, y todavía requerirían de tratamiento antes de su eliminación. Blaylock y Huang [10], proponen a la compactación de la biomasa residual cosechada a partir de procesos de la fitoextracción de metales, como un método efectivo para el manejo de dicha biomasa. La pérdida de peso seco total, de la biomasa vegetal contaminada por la compactación, es ventajosa, ya que genera un menor costo de transporte a una instalación de eliminación de residuos peligrosos [40]. Tanto la compactación, como el compostaje, generan beneficios similares; y en los cuales, el lixiviado producido, deberá ser recogido y tratado adecuadamente [40].

Un método potencial para la utilización de la biomasa residual producida a través de la fitoextracción, es la de integrar la fitorremediación a procesos de conversión termoquímica [40]. Si la fitoextracción se pudiera combinar con la generación de biomasa y esta se utilizara comercialmente como una fuente de energía, entonces, se podría integrar esta última etapa en una operación con fines de lucro, y las cenizas residuales, se podrían emplear en biominería [17]. Nicks y Chambers [92], reportaron un segundo uso potencial de las plantas hiperacumuladoras para obtener beneficios económicos en la industria minera. Esta operación, denominada fitominería, incluye la generación de ingresos mediante la extracción de metales pesados comercializables, acumulados en las cenizas de la biomasa vegetal, proceso conocido también como biominería [40].

La combustión y la gasificación son las rutas más importantes para la generación de energía eléctrica y térmica. La recuperación de esta energía a partir de biomasa por medio de la combustión o gasificación, podría ayudar a que procesos como la fitoextracción sea más rentable [40]. La conversión termoquímica de la

energía, es el mecanismo que mejor se adapta para el manejo y utilización de la biomasa residual de la fitoextracción, ya que se puede obtener una biomasa contaminada con metales de alta toxicidad, lo cual impediría que dicha materia orgánica se pudiera utilizar como forraje o como fertilizantes. Raskin *et al.* [99]) y Bridgwater *et al.* [15], han reportado a la combustión, como un método opcional para la eliminación de la biomasa residual producida en procesos de biorremoción de metales pesados. La combustión, es un método crudo en el cual se quema de biomasa, el cual debe realizarse bajo condiciones controladas, y en el cual, se logra una reducción del 2 – 5% del volumen de biomasa; en el cual, se requerirá una eliminación adecuada de las cenizas generadas. Dicho método no es favorable para el medio ambiente, ya que los gases y partículas liberadas en el proceso, pueden ser perjudiciales (dependiendo del metal presente); a través de dicho método, sólo se logra la reducción del volumen de materia orgánica, y el calor producido en el proceso se pierde [40].

La gasificación es el proceso mediante el cual la biomasa puede ser sometida a una serie de cambios químicos, que pueden producir un gas combustible con altas eficiencias térmicas. Esta mezcla de gases llamada piro-gas, puede ser quemado para la generación de energía térmica y eléctrica [40]. El proceso de gasificación de biomasa en un gasificador, es un fenómeno complejo, el cual involucra el secado, calentamiento, la descomposición térmica (pirólisis), la gasificación, y las reacciones químicas de la combustión; procesos y reacciones que ocurren simultáneamente [58].

Hetland *et al.* [48], reportó la posibilidad co-combustión (co-firing) de la biomasa vegetal, junto con carbón; es así, que sus resultados, sugirieron que la incineración reduce la masa del material vegetal contaminado con plomo, en más de un 90%, y en el cual el plomo se encontrará dividido en las cenizas. A partir de esto, es posible reciclar el residuo del metal presente en las cenizas, pero, sin embargo, no hay estimaciones del costo o de la viabilidad de este proceso [99].

Los metales liberados, permanecen en la escoria, la tecnología de limpieza moderna de los gases de combustión, aseguran la captura efectiva del polvo que contiene el metal (cenizas). Comparado con otras tecnologías para la disposición y eliminación de este tipo de contaminantes, este método es ambientalmente amigable [40].

Bridgwater *et al.* [15], informaron de que la pirólisis es un nuevo método para el tratamiento de desechos municipales, el cual puede también ser utilizado para material vegetal contaminado. La pirolisis descompone el material bajo condiciones anaeróbicas. Bajo este mecanismo, no hay emisiones al aire. Los productos finales, son el aceite del fluido pirólico y el coque; los metales pesados permanecerían en el coque, el cual podría ser utilizado en la fundición. Koppolua *et al.* [67], informaron de que el 99% del metal recuperado, se concentró en el residuo carbonoso formado por la pirolisis, a partir de la biomasa hiperacumuladora sintética, usada en un reactor a escala piloto.

En nuestra opinión, dependiendo del tipo de contaminante o metal pesado asociado a la biomasa, se debe establecer el método apropiado para la disposición de dicha biomasa. Si la biomasa por ejemplo, bioacumuló en sus tejidos, metales como el Mn^{2+} y el Fe^{2+} , entonces dicha biomasa poseería un gran potencial para ser empleada como un abono a utilizarse en la agricultura. Pero, en el caso de las aguas residuales industriales, como es nuestro caso, dichas aguas suelen presentar mezclas de diversos metales, entre ellos, algunos de gran toxicidad como son el Cd, As, Cr, entre otros; por lo tanto, en estos casos la biomasa deberá ser tratada de manera diferente. Una manera de utilizar dicha biomasa puede ser en la industria del biodiesel, siempre y cuando no esté presente el Hg, ya que dicho metal podría volatilizarse y liberarse nuevamente al ambiente. Un método adicional, para el manejo de biomasa residual contaminada con múltiples metales pesados, sería el uso de dicha biomasa en la elaboración de materiales de construcción, reteniendo dichos metales durante décadas en

estructuras. Sólo, a partir de la exploración de las diferentes opciones tecnológicas, a partir de la experimentación, y del metal o metales presentes en la biomasa residual, permitirán elegir el método idóneo de remoción y de reciclaje del metal problema.

5. CONCLUSIONES

La definición de un organismo hiperacumulador no lo determina netamente el valor hallado a partir de los índices como el FAI, FAD y FBC, si no, de la correlación de dicho valor, y de la toxicidad de cada metal pesado. La mayor parte de la literatura en la cual se evaluó la remoción del Mn, corresponde a plantas; *Chlorella sp* y *L. minor*, aun con mecanismos similares en la utilización del Mn^{2+} , debido a su tamaño y hábito probablemente discrepen mucho en su tolerancia al Mn^{2+} , frente a una planta superior. Sólo conociendo los límites de tolerancia al Mn^{2+} en *L. minor* y *Chlorella sp*, así como en organismos similares, permitirían establecer un valor específico en el FBC y determinar la real potencial como hiperacumulador. Con la pobre literatura hallada sobre la biorremediación de Mn^{2+} en macrófitas y microalgas, es complejo poder definir qué tan hiperacumulador es *L. minor* y *Chlorella sp*. Aun así, los índices FAI, FAD y FBC, permiten tener una aproximación a las capacidades de biorremoción del Mn^{2+} , por parte de los organismos valorados, insinuando que *L. minor* posee la capacidad de hiperacumular Mn^{2+} .

Al comparar los resultados de la eficiencia de biorremoción del Mn^{2+} por parte de *Chlorella sp*, se evaluó una mayor tasa en el T2, sin embargo los resultados del FBC fueron contradictorio con dicho resultado. Dichos resultados nos permiten concluir que al estudiar la biorremoción de un metal pesado, basados sólo en su cuantificación puntual o en porcentajes, se puede incurrir en subestimaciones de la real eficiencia del organismo; es más confiable una correlación de dichas valoraciones, con índices como el FBC, FAI y FAD, los cuales toman en cuenta, la relación del peso del metal removido con la concentración de biomasa que se utilizó en ello. En el T2, *Chlorella sp*, presentó una mayor eficiencia de remoción, mayor velocidad de eliminación y adsorción; sin embargo, el T1 fue igualmente

eficiente, ya que con una menor biomasa y AF, removió una mayor cantidad de Mn^{2+} , eso sí, a menor velocidad.

A partir de los resultados evaluados, *L. minor* logró su mayor remoción del Mn^{2+} en el agua residual sin esterilizar (T1), lo cual nos muestra la gran capacidad e competencia y tolerancia que tiene dicho organismo (remoción del 66,47%); por el contrario, *Chlorella sp*, logró su mayor biorremoción en el medio que fue esterilizado (T2: 66,29% de remoción), esto pudo ser causa de: a) fue el medio con mayor concentración de Mn^{2+} de entrada, ya que fue el medio donde menor Mn^{2+} fue removido por *L. minor*; b) en el medio del T2, no había competencia con otros organismos, lo cual si ocurrió en el T1. Porcentualmente, *Chlorella sp*, removió un bajo porcentaje respecto a la concentración original del agua residual, pero respecto a la concentración inicial que recibió, luego del proceso de remoción realizado por *L. minor*, fue altamente significativo; por lo tanto, *Chlorella sp*, es un organismo eficiente en la biorremoción del Mn^{2+} , pero dicha eficiencia depende de una concentración límite, requiere elevadas concentraciones del metal pesado, para que se estimule su mayor remoción.

L. minor, demostró ser un organismo altamente eficiente en la remoción de SST, logrando una remoción del 80,40 %. Dicha remoción significativa, se correlacionó positivamente con el AF. Mayores AF estimularon un mayor % de bioadsorción. Con un mayor tiempo de exposición pudo alcanzar una mayor remoción. El AF se correlacionó negativamente con la mayor remoción de los SST. A mayor AF, menor presencia de SST, por lo tanto, mayor eficiencia en la remoción.

La falta de literatura hace difícil poder comparar y concluir con mayor certeza sobre el desempeño de los organismos evaluados. Sin embargo, la utilización simultánea de las eficiencias de absorción, adsorción y biorremoción, en conjunto con los índices FAI, FAD y FBC, fue significativamente favorable en la capacidad

de entender y valorar las capacidades que *L. minor* y *Chlorella sp*, tienen en su capacidad de biorremediación.

Chlorella sp, se saturó de Mn^{2+} , el día 12, por lo tanto, para lograr una mayor remoción del metal, se podría cosechar la microalga cada 12 días. De igual manera, *L. minor* se saturó con Mn^{2+} , el día 8, por lo tanto, este debería ser el tiempo o frecuencia a partir del cual se podrían cosechar las plantas, y repetir la inoculación y estimular una mayor depuración. *L. minor* y *Chlorella sp*, presentaron una significativa tolerancia al Mn^{2+} , y a la competencia con otros organismos en el T1; la significativa capacidad de remoción de Mn^{2+} y SST en dicho medio, infiere una potencialidad promisorio de dichos organismos para tener en cuenta en la depuración de aguas residuales.

Nuestros resultados evaluaron una significativa capacidad de remoción del Mn^{2+} por parte de *L. minor*, y en una menor medida de *Chlorella sp*; en conjunto dichos organismos removieron un 74,20% en el T1 y 77,38% en el T2, de Mn^{2+} . *L. minor*, logró una significativa remoción del 80,40 % de los SST. *L. minor*, es altamente eficiente en la remoción de Mn^{2+} y de SST.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar una evaluación de los niveles de tolerancia mínimos y máximos del Mn^{2+} , en *L. minor* y *Chlorella sp*, bajo diferentes concentraciones del metal, y con diferentes concentraciones de inóculo
- A partir del establecimiento de los rangos de tolerancia de *L. minor*, evaluar su real capacidad como organismo hiperacumulador.
- Establecer experimentos complementarios bajo sistema discontinuo y continuo, para valorar la alteración de las eficiencias, y evaluar el comportamiento de *L. minor* y *Chlorella sp*, bajo un sistema distinto.
- Evaluar la posibilidad de establecer un piloto a mayor escala *in situ*, y valorar la alteración que las variables ambientales pueden generar en el comportamiento de *L. minor*.
- Investigar cual es la fracción o la tasa de consumo del Mn^{2+} que *L. minor* absorbe y utiliza en sus procesos celulares, para discriminar si acumula el metal y luego lo expulsa, como sucede en algunos organismos y para otros metales; o si por lo contrario, al ser un micronutriente, va consumiendo el Mn^{2+} que absorbió.
- Hay que establecer si la fracción de Mn^{2+} que se adsorbe, posteriormente se trasporta por absorción al interior de la planta, o si permanece adherido.
- A partir, de los resultados de los dos puntos anteriores, definir, si se justifica cosechar las plantas y realizar desorción para tratar de recuperar el Mn^{2+} , o si por lo contrario, es mejor incrementar los tiempos de exposición y permitir un mayor consumo del metal.
- Abordar los estudios de biorremediación de metales pesados, empleando nuestra perspectiva, y utilizar simultáneamente los porcentajes o eficiencias de bioabsorción, bioadsorción, biorremoción, junto con los índices FAI, FAD y FBC, junto con estudios de cinética más fuertes, pueden permitir entender mejor los mecanismos empleados en estos procesos fisiológicos y químicos.

- Realizar un mayor número de muestreos, para lograr establecer con estudios de correlaciones con mayor fortaleza.
- Evaluar la posibilidad de ajustar los modelos de cinética a una evaluación a lo largo del tiempo, y no sólo en la fase estacionaria.
- Realizar experimentos a mayor escala y muestreando un mayor peso de biomas, ya que es compleja la cuantificación de pesos, cuando se trabaja con poca biomasa.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] ABEDIN, Mohammed Joinal., FELDMANN, Jörg., & MEHARG, Andy. Uptake kinetics of arsenic species in rice plants. *Plant Physiology*. February, 2002, vol. 128, no. 3, p. 1120–1128.
- [2] AKSU, Z., & DÖNMEZ, G. 2006. Binary biosorption of cadmium (II) and nickel(II) onto dried *Chlorella vulgaris*: co-ion effect on monocomponent isotherm parameters. *En: Proc Biochem*. April, 2006, vol. 41, no. 4, p. 860–868.
- [3] AKSU, Zümriye, & KUTSAL, Tülin. 1990. A comparative study for biosorption characteristics of heavy metal ions with *C. vulgaris*. *Environ Technol*. December, 1990, vol. 11, no. 10, p. 979–87.
- [4] APHA, AWWA, and WEF (American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st ed. American Public Health Association, Washington, D.C, 2005.
- [5] ATKINSON, B., BUX, W., & KASAN, H. Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents. *Water SA*. April, 1998, vol. 24, no. 2, p. 129-135.
- [6] AXTELL, NR., STERNBERG, SP., & CLAUSSEN, K. Lead and nickel removal using *Microspora* and *Lemna minor*. *Bioresour Technol*. August, 2003, vol. 89, no. 1, p. 41–8.
- [7] BAKER, AJM., & BROOKS, RR. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*. 1989, Vol. 1, p. 81–126.
- [8] BAYRAMOGLU, Gülay., TUZUN, İhami., CELİK, Gökçe., YILMAZ, Meltem., & ARICA, MY. 2006. Biosorption of mercury(II), cadmium(II) and lead(II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*

immobilized in alginate beads. *Int J Miner Proc.* October, 2006, vol. 81, no. 1, p. 35–43.

- [9] BILOTTA, GS., & BRAZIER, RE. Understanding the influence of suspended solids on water quality and aquatic biota. *Water Research.* June, 2008, vol. 42, no. 12, p. 2849 – 2861.
- [10] BLAYLOCK, MJ., & HUANG, JW. Phytoextraction of metals. In: *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment.* Raskin and B.D. Ensley (Eds.). New York: John Wiley and Sons, 2000. p. 53–70.
- [11] BOUALI, Moez., ZRAFI, Ines., MOUNA, Feky., & BAKHROUF, Amina. Pilot study of constructed wetlands for tertiary wastewater treatment using duckweed and immobilized microalgae. *African Journal of Microbiology Research.* August, 2012, vol. 6, no. 31, p. 6066-6074.
- [12] BRADY, D., LETEBELE, B., DUNCAN, JR., & ROSE, PD. Bioaccumulation of metals by *Scenedesmus*, *Selenastrum* and *Chlorella algae*. *Water S.A.* July, 1994, vol. 20, no. 3, p. 213–8.
- [13] BRANKOVIĆ, Snezana., PAVLOVIĆ-MURATSPAHIĆ, Dragana., TOPUZOVIĆ, Marina., GLIŠIĆ, Radmila., MILIVOJEVIĆ, Jelena., & ĐEKIĆ, Vera. Metals concentration and accumulation in several aquatic macrophytes. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 2012, vol. 26, no. 1, p. 2731-2736.
- [14] BRAXTON, Davis., & FOURQUREAN, James. Competition between the tropical alga, *Halimeda incrassata*, and the seagrass, *Thalassia testudinum*. *Aquatic Botany.* May, 2001, vol. 71, p. 217–232.
- [15] BRIDGWATER, AV., MEIER, D., & RADLEIN, D. An overview of fast pyrolysis of biomass. *Org Geochem.* December, 1999, vol. 30, no. 12, p. 1479–1493.
- [16] BROCK, TD. *Biology of microorganisms. Microbiology.* 3rd ed. Englewood Cliffs, New Jersey, Prentice Hall, Inc. 07632, 1979. p. 30-35.

- [17] BROOKS, Robert R., CHAMBERS, Michael F., NICKS, Larry J., ROBINSON, & Brett H. Phytomining. Trends in Plant and Science. September, 1998, vol. 3, no. 9, p. 359-362.
- [18] BROOKS, RR., LEE, J., REEVES, RD., & JAFFRE, T. Detection of Nickeliferous Rocks by Analysis of Herbarium Specimens of Indicator Plants. J. Geochem. Exploration. October, 1977, vol. 7, p. 49-57.
- [19] BUCHANAN, Bob., GRUSEN Wilhelm, & JONES Russell. 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society. of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA. 2000. p. 1367.
- [20] CALDWEL, CR. Effect of elevated manganese on the ultraviolet and blue light-absorbing compounds of cucumber cotyledon and leaf tissues. Journal of Plant Nutrition. November, 1998, vol. 21, no. 3, p. 435-445.
- [21] CARLSSON, AS., BEILEN, JB., MÖLLER, R., & CLAYTON D. 2007. Micro-algae and macro-algae: utility for industrial applications. Ed: Dianna Bowles. Cplpress. CNAP, University of York. UK. 2007. pp. 9-33.
- [22] CASTILLO, Gabriela. 2004. Ensayos Toxicológicos y métodos de Evaluación de la Calidad de aguas. Primera edición. México: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. pp. 25-30.
- [23] CELIK, Ali., & DEMIRBAS, Ayhan. Removal of heavy metal ions from aqueous solutions via adsorption onto modified lignin from pulping wastes. Energy Sour. August, 2005, vol. 27, no. 12, p. 1167-1177.
- [24] CELIS, José., JUNOD, Julio., & SANDOVAL, Marco. Recientes aplicaciones de la depuración de aguas residuales con plantas acuáticas. Theoria. Julio, 2005, vol. 14, no. 1, p. 17-25.
- [25] CHRISTENSEN, ER., SCHERFIG, J., & DIXON, PS. Effects of manganese, copper and lead on *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella stigmatophora*. Water Research. 1979, vol. 13, no. 1, p. 79-92.
- [26] CORTÓN, E., & VIALE, A. Solucionando grandes problemas ambientales con la ayuda de pequeños amigos: las técnicas de biorremediación. Ecosistemas. Septiembre, 2006, vol. 15, no. 3, p. 1-10.

- [27] DEMIREVSKA-KEPOVA, K., SIMOVA-STOILOVA, L., STOYANOVA, Z., HÖLZER, R., & FELLER, U. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environmental and Experimental Botany*. December, 2004, vol. 52, no. 3, p. 253-266.
- [28] DOGANLAR, Zeynep., ÇAKMAK, Seher., & YANIK, Telat. Metal Uptake and Physiological Changes in *Lemna gibba* Exposed to Manganese and Nickel. *International Journal of Biology*. 2012, vol. 4, no. 3, p. 148-157.
- [29] DÖNMEZ, GC., AKSU, Z., & KUTSAL, T. A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. *Process Biochemistry*. October, 1999, vol. 34, no. 9, p. 885-892.
- [30] DOYLE, CJ., PABLO, F., LIM, RP., HYNE, RV. Assessment of metal toxicity in sediment pore water from lake Macquarie, Australia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2003, vol. 44, p. 343-350.
- [31] EHRLICH HL. *Geomicrobiology*. 3 edition. New York, USA. Marcel Dekker (Ed), 1996. 719 p.
- [32] EPA. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. "Hazardous and Solid Waste Management System; Identification and Listing of Special Wastes; Disposal of Coal Combustion Residuals from Electric Utilities." [EPA-HQ-RCRA-2009-0640; FRL-9149-4] Proposed rule.
- [33] FARGAŠOVÁ, Agáta., BUMBALOVA, Alena., & HAVRANEK, Emil. Ecotoxicological effects and uptake of metals (Cu^+ , Cu^{2+} , Mn^{2+} , MO^{6+} , Ni^{2+} , V^{5+}) in freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. *Chemosphere*. February, 1999, vol. 38, no. 5, p.1165–1173.
- [34] FAYIGA, AO., MA, LQ., CAO, X., & RATHINASABAPATHI, B. Effects of heavy metals on growth and arsenic accumulation in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environ Pollut*. November, 2004, vol. 132, no. 2, p.289–296.
- [35] FERNÁNDEZ, J., DE MIGUEL, E., DE MIGUEL, J., CURT, MD. Manual de fitodepuración. Filtros de macrófitas en flotación. Proyecto LIFE. Nuevos Filtros Verdes con Macrófitas en Flotación para la Cuenca

Mediterránea. Ayuntamiento de Lorca, Fundación Global Nature, Universidad Politécnica de Madrid (UPM) y Obra Social, 2001. 117 p.

- [36] FERNANDO, DR., BAKKAUS, EJ., PERRIER, N., BAKER, AJM., WOODROW, IE., BATIANOFF, GN., & COLLINS, RN. Manganese accumulation in the leaf mesophyll of four tree species: a PIXE/EDAX localization study. *New Phytologist*. 2006, vol. 171, no. 4, p. 751-758.
- [37] FOUREST, E., & ROUX, JC. Heavy metals biosorption by fungal mycelial by-products: mechanisms and influence of pH. *Applied Microbiology and Biotechnology*. June, 1992, vol. 37, no. 3, p. 399-403.
- [38] GARBISU, C., & ALKORTA, I. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology*. May, 2001, vol. 77, no. 3, p. 229-236.
- [39] GARNHAM, Geoffrey W., CODD, Geoffrey A., & GADD, Geoffrey M. Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella salina*. *Appl Microbiol Biotechnol*. May, 1992, vol. 37, no. 2, p. 270-276.
- [40] GHOSH, M., & SINGH, SP. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Applied Ecology and Environmental Research*. 2005, vol. 3, no. 1, p. 1-18.
- [41] GUÍA AMBIENTAL PLANTAS CARBOELÉCTRICAS. file:///C:/blanca dizeo/Guías Resolución 1023 del 28 de julio de 2005/Guía ambiental para proyectos carboeléctricos/contenid/analisis.htm
- [42] GUILLARD, RLL. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. 29-60. En: *Culture of Marine Invertebrates Animals*. New York: M.L. Smith y M.H. Chanley (Ed.). Plenum Press. 338 pp.
- [43] GUPTA, VK., & RASTOGI, A. Biosorption of lead from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species: kinetics and equilibrium studies. *J Hazard Mater*. March, 2008, vol. 152, no. 1, p. 407–414.
- [44] HAMMOUDA, O., GABER, S., & ABDUL-HAMEED, M. Assessment of the effectiveness of treatment of wastewater contaminated aquatic

systems with *Lemna gibba*. *Enzyme Microb. Technol.* April, 1995, vol. 17, no. 4, p. 317–323.

- [45] HART, BA., BERTRAM, KR., & SCAIFE, BD. Cadmium transport by *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ Res.* April, 1979, vol. 18, no. 2, p. 327–335.
- [46] HARVEY, RM., & FOX, JL. Nutrient Removal Using *Lemna minor*. *Water Pollution Control Federation.* September, 1973, vol. 45, no. 9, p. 1928-1938.
- [47] HAYGARTH, PM., BILOTTA, GS., BOL, R., BRAZIER, R., BUTLER, PJ., FREER, J., GIMBERT, LJ., GRANGER, SJ., KRUEGER, T., NADEN, P., OLD, G., QUINTON, JN., SMITH, B., & WORSFOLD, PJ. Processes affecting transfer of sediment and colloids, with associated phosphorus, from intensively farmed grasslands: an overview of key issues. *Hydrol. Process.* December, 2006, vol. 20, no. 20, p. 4407–4413.
- [48] HETLAND, MD., GALLAGHER, JR., DALY, DJ., HASSETT, DJ., & HEEBINK, LV. 2001. Processing of plants used to phytoremediate lead-contaminated sites. En: *Phytoremediation, Wetlands, and Sediments – The Sixth International in situ and on-site Bioremediation Symposium*, San Diego, California, 4–7 June. Battelle Press, Columbus, Richland. Leeson, A., Foote, E.A., Banks, M.K., Magar, V.S. (Eds.). p. 129–136.
- [49] HO, YS., & MCKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochemistry.* 1999, vol. 34, p. 451–465.
- [50] HODAIFA, Gassan., MARTÍNEZ, María Eugenia., ÓRPEZ, Rafael., & SÁNCHEZ, Sebastián. "Inhibitory effects of industrial olive-oil mill wastewater on biomass production of *Scenedesmus obliquus*". *Ecol. Eng.* May, 2012, vol. 42, p. 30-34.
- [51] HOLAN, ZR., & VOLESKY, B. Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae. *Biotechnol Bioeng.* 1994, vol. 43, p. 1001–9.
- [52] HOU, Wenhua., CHEN, Xiao., SONG, Guanling., WANG, Qunhui., & CHANG, Chein Chi. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted

waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). Plant Physiology and Biochemistry. January, 2007, vol. 45, no. 1, p. 62-69.

- [53] HUNT, R. Plant growth analysis. Studies in biology. London: Edward Arnold, 1978. 67 p.
- [54] HUNT, R., CAUSTON, DR., SHIPLEY, B., & ASKEW, AP. A modern tool for classical growth analysis. Annals of Botany. October, 2002, vol. 90, no. 4, p. 485-488.
- [55] HURD, NA., & STERNBERG, SPK. Bioremoval of Aqueous Lead Using *Lemna minor*. Internat J Phytoremediat. August, 2008, vol. 10, no. 4, p. 278-288.
- [56] IGWE, JC., & ABIA, AA. A bioseparation process for removing heavy metals from wastewater using biosorbents. Africa Journal of Biotechnology. June, 2006, vol. 5, no. 12, p. 1167-1179.
- [57] ISO. Water quality – Determination of the toxic effect of water constituents and water to duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test. ISO TC 147/SC 5 N, International Organization for Standardisation, Geneva, 2001. 26 p.
- [58] IYER, PVR., RAO, TR. & GROVER, PD. Biomass Thermochemical characterization. Third edition, 2002. 38 p.
- [59] KADIRVELU, K., THAMARASELVI, K., & NAMASIVAYAM, C. Removal of heavy metals from industrial wastewaters by adsorption onto activated carbon prepared from an agricultural solid waste. Bioresour Tech. January, 2001, vol. 76, no. 1, p. 63-65.
- [60] KANUNGO, SB., & MOHAPATRA, R. Leaching behavior of various trace metals in aqueous medium from two fly ash samples. J. Environ. Qual. May, 2000, vol. 29, no. 1, p. 188–96.
- [61] KARNIKA, H., REDDY, S., SARADHI, V., SINGH, J., SURYANARAYANA, V., & VENKATESHWAR, P. Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal. African Journal of Biotechnology. December, 2007, vol. 6, no. 25, p. 2924-2931.

- [62]** KESSLER, E., ARTHUR, W., & BRUGGER, JE. The Influence of Manganese and Phosphate on Delayed Light Emission, Fluorescence, Photoreduction and Photosynthesis in Algae. Archives of biochemistry and biophysics. October, 1957, vol. 71, no. 2, p. 326-335.
- [63]** KIDD, PS., BECERRA, C., GARCÍA, M., & MONTERROSO, C. Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural: el género *Alyssum* L. Ecosistemas. Mayo, 2007, vol. 16, no. 2, p. 26-43.
- [64]** KNAUER, Katja., JABUSCH, Thomas., & SIGG Laura. Manganese uptake and Mn(II) oxidation by the alga *Scenedesmus subspicatus*. Aquat.sci. January, 1999, vol. 61, no. 1, p. 44–58.
- [65]** KNAUER, K. Interactions of trace metals (Cu, Zn and Mn) with freshwater phytoplankton. Ph.D. Thesis No. 11802, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich, 1996. 118 p.
- [66]** KOCHIAN, L., HOEKENGA, O., & PIÑEROS, M. How do crops plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorus efficiency. Annu. Rev. Plant Biolog. 2004, vol. 55, p. 459-93.
- [67]** KOPPOLUA, Lakshmi., AGBLOVER, Agblevor., & CLEMENTS, Davis. Pyrolysis as a technique for separating heavy metals from hyperaccumulators. Part II: Lab-scale pyrolysis of synthetic hyperaccumulator biomass. Biomass and Bioenergy. December, 2003, vol. 25, no. 6, p. 651 – 663.
- [68]** KRONVANG, B., LAUBEL, A., LARSEN, SE., & FRIBERG, N. Pesticides and heavy metals in Danish streambed sediment. Hydrobiologia. March, 2003, vol. 494, no. 1–3, p. 93–101.
- [69]** KUMAR, PB., DUSHENKOV, AN., MOTTO, V., & RASKIN, I. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. Environ. Sci. Technol. May, 1995, vol. 29, no. 1, p. 1232-1238.
- [70]** LANDOLT, E. The Family of Lemnaceae: A monographic Study (Vol 1). Biosystematic Investigation in the Family of Duckweeds,

Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der ETH 1, Geobotanischen Institutes, Stiftung Rübél, Zürich, 1986. 566 p.

- [71] LAZARIDIS, NK., & ASOUHIDOU, DD. Kinetics of sorption removal of chromium (VI) from aqueous solutions by calcined Mg–Al–CO₃ hydrotalcite. *Water Research*. July, 2003, vol. 37, no. 12, p. 2875–2882.
- [72] LICHTENTHALER, HK. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Method Enzymol*. 1987, vol. 148, p. 350-382.
- [73] LIZIERI, Claudinea., AGUIAR, Rosane., & NAOMI-KUKI, Kacilda. Manganese accumulation and its effects on three tropical aquatic macrophytes: *Azolla caroliniana*, *Salvinia minima* and *Spirodela polyrhiza*. *Rodriguésia*. 2011, vol. 62, no. 4, p. 909-917.
- [74] LÓPEZ, Neus., PÉREZ, Rafael., VÁZQUEZ, Felícitas., VALERO, Francisco., & SÁNCHEZ, Antoni. Immobilization of different *Candida rugosa* lipases by adsorption onto polypropylen powder; application to quiral synthesis of ibuprofen and 2-phenyl-1-cyclohexanol esters. *J Chem Technol Biothech*. January, 2002, vol. 77, no. 2, p. 175-8.
- [75] MADIGAN, MT., MARTINKO, JM., & PARKER, J. Brock Biology of Microorganisms. 10th ed. Pearson Education Inc., Upper Saddle River, NJ, 2003. 1385 p.
- [76] MAMUN, A., AMID, A., KARIM, IA., & RASHID, SS. Phytoremediation of Partially Treated Wastewater by *Chlorella vulgaris*. International Conference on Chemical Processes and Environmental issues (ICCEEI'2012). Singapore, 2012.
- [77] MANE, PC., & BHOSLE, AB. Bioremoval of Some Metals by Living Algae *Spirogyra sp.* and *Spirullina sp.* from aqueous solution. *Int. J. Environ. Res*. 2012, vol. 6, no. 2, p. 571-576.
- [78] MANG, S., & TROMBALLA, HW. Uptake of cadmium by *Chlorella fusca*. *Z Pflanzenphysiol*. 1978, vol. 90, p. 293-302.

- [79] MARTELO, Jorge., & LARA, Jaime. Macrófitas flotantes en el tratamiento de aguas residuales; una revisión del estado del arte. *Ingeniería y Ciencia*. 2012, vol. 8, no. 15, p. 221-243.
- [80] MILLALEO, R., REYES-DÍAZ, M., IVANOV, AG., MORA, ML., & ALBERDI, M. Manganese as essential and toxic element For plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2010, vol. 10, no. 4, p. 476-494.
- [81] MILLER, GT. *Environmental Science Working with the Earth*, 5th edition. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, USA, 1995.
- [82] MIRETZKY, Patricia., SARALEGUI, Andrea., & FERNÁNDEZ CIRELLI, Alicia. Aquatic macrophytes potential for simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). *Chemosphere*. 2004, vol. 57, p. 997–1005.
- [83] MKANDAWIRE, Martin., & DUDEL, EG. Are *Lemna spp.* Effective Phytoremediation Agents?. *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability*. 2007, vol. 1, no. 1, p. 56-71.
- [84] MKANDAWIRE, M., TAUBER, B., & DUDEL, EG. Biosorption capacity and limits in uranium immobilisation by dead and living *Lemna gibba* L, biomass. En: *Proceedings of Seconds European Biorremediation Conference, Technical University of Crete and European Community (High-level Scientific Conference Programme)*, Chania, Creta Greece: Kalogerakis N (Ed), 2003. p. 357-360.
- [85] MOTOYUKI, S. *Adsorption Engineering*. Elsevier Sci. Publishers, 1990. pp. 5 – 61.
- [86] MUNAWAR, M., NORWOOD, WP., & McCARTHY, LH. A method for evaluating the impacts of navigationally induced suspended sediments from the Upper Great Lakes connecting channels on the primary productivity. *Hydrobiologia*. July, 1991, vol. 219, no. 1, p. 325-332.
- [87] MUÑOZ, Raul., ALVAREZ, María Teresa., MUÑOZ, Adriana., TERRAZAS, Enrique., GUIEYSSE, Benoit., & MATTIASSON, Bo.

Sequential removal of heavy metal ions and organic pollutants using an algal-bacterial consortium. *Chemosphere*. May, 2006, vol. 63, no. 6. p. 903–911.

- [88] MUÑOZ, Raul., & GUIEYSSE, Benoit. "Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review" *Water Res.* August, 2006, vol. 40, no. 15, p. 2799-2815.
- [89] NACORDA, June Owen., MARTINEZ, Milagrosa., & TORRETA, Nerissa. Bioremoval and Bioreduction of Chromium (VI) by the Green Microalga, *Chlorella vulgaris* Beij., Isolated from Laguna de Bay, Philippines. *Philippine Journal of Science*. December, 2010, vol. 139, no. 2, p. 181-188.
- [90] NEAL, BG., LAWRENCE, EB., & WENDT, JL. Alkali metal partitioning in Ash from pulverized coal combustion. *Combust. Sci. Tech.* 1990, vol. 74, no. 1-6, p. 211 –214.
- [91] NICHOLS, HW., BOLD, HC. Growth media – Fresh water. In: Stein JR (ed.) *Hand*, 1965.
- [92] NICKS, L., & CHAMBERS, MF. Nickel farm. *Discover*. September, 1994. p.19.
- [93] NÚÑEZ, R., MEAS, AVY., ORTEGA, R., & ORGUÍN, EJ. Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. *Ciencia. Revista de la Academia Mexicana de ciencias*. Julio – Septiembre, 2004, vol. 55, p. 69-82.
- [94] NWUCHE, C., & UGOJI, E. Effects of heavy metal pollution on the soil microbial activity. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 2008, vol. 5, no. 2, p. 409-414.
- [95] OLGUÍN, EJ., SÁNCHEZ-GALVÁN, G., PÉREZ-PÉREZ, T., & PÉREZ-OROZCO, A. Surface adsorption, intracellular accumulation and compartmentalization of Pb(II) in batch-operated lagoons with *Salvinia minima* as affected by environmental conditions, EDTA and nutrients. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2005, vol. 32, p. 577-586.

- [96] PATRA, Manomita., BHOWMIK, Niladri., BANDOPADHYAY, Bulbul., & SHARMA, Archana. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. December, 2004, vol. 52, no. 3, p. 199-223.
- [97] PERSAUD, D., JAAGUMAGI, R., & HAYTON, A. Guidelines for the protection and management of aquatic sediment quality in Ontario. Ontario Ministry of the Environment, Toronto, Ontario, 1992. 26 p.
- [98] RASBAND, WS. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Bethesda, Maryland, USA, 2011.
- [99] RASKIN, Ilya., SMITH, Robert D., & SALT, David E. Phytoremediation of metals: Using plants to remove pollutants from the environment. *Curr Opin Biotechnol*. 1997, vol. 8, no. 2, p. 221-226.
- [100] REETA, D., SOOKNAH, A., & WILKIE, AC. Nutrient removal by floating aquatic macrophytes cultured in anaerobically digested flushed dairy manure wastewater. *Ecological Engineering*. 2004, vol. 22, p. 27–42.
- [101] REZAI, K., & FARBOODINA, T. Manganese Toxicity Effects on Chlorophyll Content and Antioxidant Enzymes in Pea Plant (*Pisum sativum* L. c.v qazvin). *Agricultural Journal*. 2008, vol. 3, no. 6, p. 454-458.
- [102] ROLDÁN, G. Fundamentos de limnología tropical. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia, 1992. 529 p.
- [103] RUETER, JG., & MOREL, FMM. The interaction between zinc deficiency and copper toxicity as it affects the silicic acid uptake mechanisms in *Thalassiosira pseudonana*. *Limnol Oceanogr*. January, 1981, vol. 26, no. 1, p. 67-73.
- [104] RYAN, PA. Environmental effects of sediment on New Zealand streams: a review. *New Zealand J. Mar. Freshwater Res*. 1991, vol. 25, no. 2, p. 207–221.
- [105] SÁNCHEZ-GALVÁN, Gloria., MONROY, Oscar., GÓMEZ, Jorge., OLGUÍN, Eugenia. Assessment of the Hyperaccumulating Lead Capacity of

Salvinia minima Using Bioadsorption and Intracellular Accumulation Factors. Water Air Soil Pollut. October, 2008, vol. 194, no. 1-4, p. 194:77–90.

- [106] SÁNCHEZ-GALVÁN, Gloria. “Mecanismos de adsorción y acumulación intracelular de Pb^{2+} en *Salvinia mínima*”. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México, 2010. p. 1-129.
- [107] SEKABIRA, K., ORYEM ORIGA, H., BASAMBA, A., MUTUMBA, G., & KAKUDIDI, E. Application of algae in biomonitoring and phytoextraction of heavy metals contamination in urban stream water. Int. J. Environ. Sci. Tech. 2011, vol. 8, no. 1, p. 115-128.
- [108] SIDERIS, CP., & YOUNG, NY. Growth and chemical composition of *Ananas Comosus* (L.) Merr. In solution cultures with different iron-manganese ratios. Plant Physiol. May, 1949, vol. 24, no. 2, p. 416-40.
- [109] SKILLICORN, P., SPIRA, W., & JOURNEY, W. Duckweed Aquaculture. A new aquatic farming system for developing countries. A World Bank Publication. Washington, D.C, 1993. 76 p.
- [110] SOROKIN, C. Dry weigh, packed cell volume and optical density. En: Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurement. Cambridge University Press, New York. Stein, J. R. (Ed.), 1973. p. 321-343.
- [111] SUNDA, WG., & HUNTSMAN, SA. Relationships among growth rate, cellular manganese concentrations and manganese transport kinetics in estuarine and oceanic species of the diatom *Thalassiosira*. J Phycol. September, 1986, vol. 22, no. 3, p. 259-270.
- [112] SUNDA, William G., & HUNTSMAN, Susan A. Antagonisms between cadmium and zinc toxicity and manganese limitation in a coastal diatom. Limnol Oceanogr. May, 1996, vol. 41, no. 3, p. 373–387.
- [113] SUNDA, WG., & HUNTSMAN, SA. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. The Science of the Total Environment. 1998a, vol. 219, p. 165-181.

- [114] SUNDA, WG., & HUNTSMAN, SA. Interactions among Cu^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} in controlling cellular Mn, Zn, and growth rate in the coastal alga *Chlamydomonas*. *Limnol Oceanogr.* 1998b, vol. 43, no. 6, p. 1055–1064.
- [115] TAM, NFY., WONG, YS., & SIMPSON, CG. Removal of Copper by Free and Immobilized Microalga, *Chlorella vulgaris*. Chapter 2. Wastewater Treatment with Algae. Edited by Y.S. Wong and N.F.Y. Tam. Springer, 1997. p. 17-36.
- [116] THERMAL POWER PLANTS. Fuji Electric Group. Tokyo, Japan. Fuji Electric Review Chapter 3, Vol.51, 2005. p. 1-38.
- [117] TING, YP., LAWSON, F., & PRINCE,, IG. Uptake of cadmium and zinc by the alga *Chlorella vulgaris*. Part II. Multi-ion situation. *Biotechnol Bioeng.* 1991, vol. 37, p. 445-455.
- [118] TRAVIESO, L., BENÍTEZ, F., SÁNCHEZ, ES., BORJA, R., COLMENAREJO, MF. Production of Biomass (Algae-Bacteria) by Using a Mixture of Settled Swine and Sewage as Substrate. *Journal of Environmental Science and Health A Tox Hazard Subst Eng.* 2006, vol. 41, no. 3, p. 415–429.
- [119] VISSOTTIVISETH, P., FRANCESCONI, B., & RIDOKCHANA, W. The potencial of *Thai indigenous* plant species for the phytoremediation of arsenic contaminated land. *Environmental Pollution.* August, 2002, vol. 118, no. 3, p. 453-461.
- [120] WANG, L., MIN, M., LI, Y., CHEN, P., CHEN, Y., LIU, Y., WANG, Y., & RUAN, R. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Application of Biochemical Biotechnology.* October, 2010, vol. 162, no. 4, p. 1174-1186.
- [121] WATERS, Thomas F. Sediment in streams: sources, biological effects and controls In *American Fisheries Society Monograph 7*, Bethesda, Maryland, 1995. 251 p.

- [122] WHITEHEAD, PG., & PRIOR, H. Bioremediation of acid mine drainage: an introductory overview of the Wheal Jane Wetlands project. *Sci Total Environ.* February, 2005, vol. 338, no. 1-2, p.15–21.
- [123] ZAR, JH. *Biostatistical Análisis*. 4 ed. New Jersey. Prentice Hall, Inc, 1999. 929 p.
- [124] ZAYED, Adel., SUARNALATHA, Gowthaman., & TERRY, Norman. Phytoaccumulation of trace elements by wetlands plants: I. Duckweed. *J Environ Qual.* May, 1998, vol. 27, no. 3, p. 715–721.
- [125] ZIMMO, OR., VAN DER STEEN NP., & GIJZEN, HJ. Nitrogen mass balance across pilot-scale algae and duckweed-based wastewater stabilisation ponds. *Water Res.* February, 2004, vol. 38, no. 4, p. 913-920.