

BIORREMEDIACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES, SUSPENDIDOS Y DISUELTOS  
EN AGUAS RESIDUALES DE UNA CENTRAL TÉRMICA, MEDIANTE EL USO  
DE *Lemna minor* Y *Chlorella sp.*

OLMER JULIAN TOLOZA MORENO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGIA  
BUCARAMANGA

2013

BIORREMEDIACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES, SUSPENDIDOS Y DISUELTOS  
EN AGUAS RESIDUALES DE UNA CENTRAL TÉRMICA, MEDIANTE EL USO  
DE *Lemna minor* Y *Chlorella sp.*

OLMER JULIAN TOLOZA MORENO

Trabajo de Grado para optar al título de Biólogo

DIRECTOR

PH. D VIATCHESLAV KAFAROV

TUTOR

PH. D VIATCHESLAV KAFAROV

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGIA

BUCARAMANGA

2013

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a Dios, por permitirme estar vivo y existir y por darme una familia tan maravillosa, mis amados padres y hermanos, quienes han sido un apoyo incondicional para mí. Gracias a mi papa por creer siempre en mí y a mi mama por su comprensión y paciencia. Este ha sido un proceso, no solo académico sino también personal, porque ha trascendido a mi alma, me ha hecho crecer como persona, como ser humano, a luchar por las cosas que quiero alcanzar y a sentir amor por la vida y lo maravillosa que puede llegar a ser. También a mi querida abuela, que también siempre ha estado para mí cuando más lo he necesitado, muchas gracias a ella por brindarme más que un lazo familiar, porque en ella he encontrado una verdadera amistad. También quiero agradecer a personas muy especiales, con quienes he compartido los mejores momentos de mi vida, personas que me han ofrecido una amistad sincera y sin reproches ni reparos, a Tatiana Ortiz y Fabián Pabón, quienes me enseñaron el verdadero significado de la palabra Amigo. Siempre han sido un gran apoyo para mí y sin importar que tan duras estén las cosas siempre encuentran la manera de verlas mucho mejor y superarlas, lo que me inspira a seguir adelante, continuar con mi camino, seguir evolucionando como persona, como ser humano. Y la lista de amigos es muy larga pero cuando alguno de ellos lea esto sentirán a través del papel mi verdadera intención de darles las gracias por existir. A la escuela de Biología y todo su cuerpo docente, muchas gracias, formaron parte de años maravillosos en mi vida, aprendí mucho. También a los administrativos y técnicos de laboratorio, siempre fueron todos muy amables y buenas personas. Finalmente agradezco a Javier Cújar Villamizar quien me ofreció trabajar en esta pasantía de investigación la cual me agrado mucho, a pesar del arduo trabajo y esfuerzo, pero valió la pena porque se ha logrado el objetivo. Estoy seguro que culminada esta etapa de mi vida, me seguirán acompañando muchas personas de las cuales aprenderé y serán un gran apoyo, con mucha fuerza y valentía continuare mi camino y como me dijo una persona muy especial “nos veremos en otro carnaval”.

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	14
1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
1.1 Caracterización del agua.....	19
1.2 Evaluación de los Sólidos.....	20
1.3 Parámetros de crecimiento para Lemna minor.....	22
1.3.1 Cálculo del Área Foliar.....	22
1.3.2 Medición de Clorofila a y Carotenos .....	22
1.3.3 Peso Fresco y Peso Seco.....	23
1.4 Parámetros de crecimiento para Chlorella sp.....	23
1.4.1 Medición de Clorofila a y Carotenos .....	23
1.4.2 Peso Seco.....	24
1.4.3 Análisis Estadístico .....	24
1.4.4 Experimento y Tratamientos .....	25
2. RESULTADOS.....	26
2.1 Eficiencia de Biorremoción de Sólidos por parte de Lemna minor .....	26
2.2 Eficiencia de Biorremoción de Sólidos por parte de Chlorella sp .....	28
2.3 Efecto de los Sólidos en el crecimiento de Lemna minor .....	30
2.3.1 Área Foliar .....	31
2.3.2 Clorofila a y Carotenos.....	31
2.3.3 Peso Fresco y Peso Seco.....	32

2.4 Efecto de los Sólidos en el crecimiento de Chlorella sp .....	33
2.4.1 Clorofila a y Carotenos.....	33
2.4.2 Peso Seco.....	34
3. ANALISIS DE LOS RESULTADOS.....	35
3.1 Eficiencia de Biorremoción de Sólidos por parte de Lemna minor .....	35
3.2 Eficiencia de Biorremoción de Sólidos por parte de Chlorella sp .....	37
3.3 Efecto de los Sólidos en el crecimiento de Lemna minor .....	38
3.3.1 Área Foliar .....	38
3.3.2 Clorofila a y Carotenos.....	39
3.3.3 Peso Fresco y Peso Seco.....	39
3.4 Efecto de los Sólidos en el crecimiento de Chlorella sp .....	40
3.4.1 Clorofila a y Carotenos.....	40
3.4.2 Peso Seco.....	40
4. CONCLUSIONES.....	42
RECOMENDACIONES .....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44
ANEXOS.....	52

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización del agua residual.....	19
Tabla 1. Resultados del Kruskal-Wallis de los sólidos evaluados para <i>L. minor</i> en las variables independientes; tiempo (días) y tratamiento, se muestran los valores del test estadístico (H) y los valores de p cuyos valores en rojo indican las diferencias significativas.....	26
Tabla 2. Resultados del Kruskal-Wallis de los sólidos evaluados para <i>Chlorella sp</i> en las variables independientes; tiempo (días) y tratamiento, se muestran los valores del test estadístico (H) y los valores de p cuyos valores en rojo indican las diferencias significativas.....	28
Tabla 3. Resultados del Kruskal-Wallis de los parámetros de crecimiento evaluados para <i>L. minor</i> en las variables independientes; tiempo y tratamiento, se muestran los valores del estadístico (H) y los valores de p cuyos valores en rojo indican las diferencias significativas.....	31
Tabla 4. Resultados de Kruskal-Wallis para los parámetros de crecimiento evaluados para <i>Chlorella sp</i> en las variables; tiempo (días) y tratamiento, se muestran los valores del test estadístico (H) y los valores de p cuyos valores en rojo indican las diferencias significativas.....	34

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. **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. En el ciclo inicial, el espécimen inoculado es *L. minor* y en el ciclo final el inóculo es *Chlorella sp.*.....25
- Figura 2. Comparación de las concentraciones de los Sólidos Totales (ST), Sólidos Suspendidos Totales (SST) y Sólidos Disueltos Totales (SDT) entre los tratamientos, a través del tiempo, en el ciclo inicial con *L. minor*.....27
- Figura 3. Comparación de los porcentajes de reducción de los Sólidos Totales (ST), Sólidos Suspendidos Totales (SST) y Sólidos Disueltos Totales (SDT), en el ciclo inicial con *L. minor*..... 27
- Figura 4. Comparación de las concentraciones de Sólidos Suspendidos Totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV) y los sólidos suspendidos fijos (SSF), que representan el valor real de los Sólidos Suspendidos, entre los tratamientos a través del tiempo, en el ciclo final con *Chlorella sp.*.....29
- Figura 5. Comparación de las concentraciones de los Sólidos Totales (ST) y Sólidos Disueltos Totales (SDT) en función del tiempo, en el ciclo final con *Chlorella sp.*.....30
- Figura 6. Crecimiento del Área Foliar en cada uno de los tratamientos a través del tiempo, en el ciclo inicial con *L. minor*..... 31

Figura 7. Comparación de las cantidades de Clorofila A y Carotenos (mg g<sup>-1</sup>) entre los tratamientos a través del tiempo, en el ciclo inicial con *L. minor*.....32

Figura 8. Comparación de las cantidades de peso fresco y peso seco (g) entre los tratamientos a través del tiempo, en el ciclo inicial con *L. minor*.....33

Figura 9. Comparación de las cantidades de Clorofila A y Carotenos (mg g<sup>-1</sup>) entre los tratamientos a través del tiempo, en el ciclo final con *Chlorella sp.*.....34

Figura 10. Comparación de las cantidades de peso seco en los tratamientos a través del tiempo, en el ciclo final con *Chlorella sp.*.....35

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Medio de cultivo Bold Basal.....	52
---	----

## RESUMEN

**TITULO:** BIORREMEDIACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES, SUSPENDIDOS Y DISUELTOS EN AGUAS RESIDUALES DE UNA CENTRAL TÉRMICA, MEDIANTE EL USO DE *Lemna minor* Y *Chlorella sp*\*

**AUTORES:**

TOLOZA Moreno Olmer Julian\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Biorremediación, *Lemna minor*, *Chlorella sp*, sólidos, crecimiento, aguas residuales.

La contaminación del agua por sedimentos y demás partículas insolubles en suspensión, pueden disminuir la actividad fotosintética en el agua y alterar el equilibrio biótico lo que afecta negativamente los ecosistemas y recursos naturales. En el presente trabajo se propuso un sistema de biorremediación de aguas residuales de una central térmica, que incluyó el uso de la macrófita *Lemna minor* y las microalgas *Chlorella sp* para mitigar la contaminación de los sólidos en el agua.

Se estableció un sistema con dos ciclos consecutivos de biorremediación, iniciando con *L. minor*, y continuado con *Chlorella sp*, cada uno se mantuvo durante 16 días de exposición al agua residual. Se establecieron dos tratamientos; el T1 con agua residual más inóculo de espécimen, y el T2 con agua residual esterilizada, más inóculo de espécimen; de igual manera se estableció un control. Con las microalgas se determinaron los sólidos suspendidos volátiles y fijos (sólidos suspendidos totales reales) además de los sólidos totales y sólidos disueltos totales. Se evaluó la cantidad de sólidos removidos, y el efecto de algunos parámetros que indican el crecimiento de las dos especies.

*Lemna minor* presentó una mayor eficiencia en la biorremediación de los sólidos suspendidos totales con valores entre 70% y 90%. Todos los parámetros de crecimiento presentaron diferencias significativas mostrando incrementos en cada uno de ellos.

*Chlorella sp* presentó biorremediación de los sólidos suspendidos fijos casi en un 100%. En cuanto a la cantidad de pigmentos hubo disminución y el parámetro peso seco fue alterado significativamente y fluctuó a lo largo de los días de exposición al agua residual.

\*Trabajo de grado

\*\*Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Ph.D. KAFAROV Viatcheslav

## ABSTRACT

**TITLE:** BIOREMEDIATION OF TOTAL SOLIDS, SUSPENDED AND DISSOLVED IN WASTEWATERS FROM A THERMAL POWER PLANT, THROUGH THE USE OF *Lemna minor* AND *Chlorella sp*\*

**AUTHORS:**

TOLOZA Moreno Olmer Julian\*\*

**KEY WORDS:** Bioremediation, *Lemna minor*, *Chlorella sp*, solids, growth, wastewaters.

Water pollution by sediments and other suspended insoluble particles may decrease photosynthetic activity in the water and alter the biotic balance negatively affecting ecosystems and natural resources. In this paper we proposed a system for bioremediation of wastewater from a thermal power station, which included the use of macrophyte *Lemna minor* and the microalgae *Chlorella sp* to mitigate pollution of the solids in the water.

Was established a system with two consecutive cycles of bioremediation, starting with *L. minor*, and continued with *Chlorella sp*, each one for 16 days of exposure to wastewater. Were established the treatments, the T1 had wastewater and specimen inoculum, and the T2 had sterilized wastewater and specimen inoculum; likewise was established a control. With the microalgae were determined volatile suspended solids and fixed suspended solids (real total suspended solids) as well as total solids and total dissolved solids. Was assessed the amount of solids removed, and the effect of some parameters that indicate the growth of both species.

*Lemna minor* showed a higher efficiency in the bioremediation of total suspended solids with values between 70% and 90%. All growth parameters had significant differences showing increases in each of them.

*Chlorella sp* showed bioremediation fixed suspended solids almost 100%. Regarding the amount of pigment was decreased and the dry weight was altered parameter significantly and fluctuated during the days exposure to waste water.

\*Thesis

\*\*Science faculty. Biology department. Director: Ph.D. KAFAROV Viatcheslav

## INTRODUCCIÓN

La contaminación del agua es un problema que afecta su calidad, por ello el tratamiento de efluentes es considerado una de las estrategias actuales para el manejo de la calidad del agua (Salgado-Bernal et al, 2012). Uno de los grandes contaminantes de las fuentes hídricas es el carbón, una de las principales fuentes de energía mundial. Sin embargo, las cenizas resultante de la combustión del carbón la cual contiene por lo general metales pesados (EPA, 2009). Además, los sedimentos y demás partículas insolubles (en el suelo y otros sólidos) en suspensión, pueden también reducir la actividad fotosintética y alterar el equilibrio biótico (Miller, 1995), esta es una situación que altera tanto los recursos naturales, como los ecosistemas que se ven impactados negativamente por la presencia de tóxicos químicos en el medio ambiente (Faisal & Hasnain, 2004, Thermal Power Plants, 2005). En conclusión, las cenizas de carbón, que forman parte de los sólidos, tienen el potencial de causar daños físicos de la salud y el desarrollo, e incluso contribuir a la mortalidad (Gottlieb et al, 2010).

Las centrales termoeléctricas que producen energía eléctrica a partir de la combustión de combustibles fósiles se consideran de gran importancia para el desarrollo de la sociedad en su crecimiento y necesidades a nivel mundial. Debido a la gran demanda de fuentes energéticas y las alzas en el precio del petróleo y gasolina, el carbón se posiciona como fuente principal por sus reservas y bajo costo. Además cabe resaltar que en nuestro país es una importante fuente de recursos energéticos y económicos (UPME, 2006). En Colombia, la generación de energía eléctrica está representada en un 63,3% por generación hidroeléctrica, un 32,1% corresponde a generación térmica (carbón con el 5,22% y gas el 26,84%.) y 4,3% de plantas menores y cogeneración.

El termino solidos suspendidos (SS) hace referencia a la masa (mg) o concentración ( $\text{mgL}^{-1}$ ) de la materia orgánica e inorgánica presente en una columna de agua de un arroyo, rio o lago depositada como producto de la turbulencia. Los SS normalmente están compuestos por partículas finas con un diámetro menor a 62  $\mu\text{m}$  (Waters, 1995), la investigación ha demostrado que el transporte, para la mayoría de los sólidos, suele ocurrir por la formación de grandes flóculos agregados (Droppo et al, 1997, Droppo, 2001). Así que, el término “Solidos Suspendidos Totales (SST)”, es referido a pequeñas partículas de sólidos dispersas en el agua, no disueltas; residuos no filtrables (componentes orgánicos e inorgánicos) presentes en una muestra de agua natural o residual ya sea industrial o doméstica. Técnicamente descrito y constituido por solidos sedimentables, sólidos en suspensión y solidos coloidales, cuyo tamaño de partícula no pase del filtro estándar de fibra de vidrio (IDEAM, 2002).

Existe otra clase de solidos llamados “Solidos Disueltos Totales (SDT)”, que corresponden al total de residuos sólidos filtrables (sales y residuos orgánicos) a través de una membrana con poros de 2.0  $\mu\text{m}$  (o más pequeños) y comprenden las sales inorgánicas (principalmente de calcio, magnesio, potasio y sodio, bicarbonatos, cloruros y sulfatos) y pequeñas cantidades de materia orgánica que están disueltas en el agua. Los SDT presentes en el agua de consumo proceden de fuentes naturales, aguas residuales, escorrentía urbana y aguas residuales industriales (OMS, 2003).

Las concentraciones de SDT se correlacionan positivamente con la productividad en lagos y al mismo tiempo, los sólidos disueltos afectan la penetración de luz en la columna de agua, afectando la absorción selectiva de las diferentes longitudes de onda en el espectro de luz visible, y por ende alterando de forma negativa la actividad fotosintética que en ultimas es la que genera el oxígeno necesario para

la vida acuática, ocasionando alteraciones en el color y turbidez del agua. Hay una estrecha relación entre turbidez y sólidos disueltos (Manahan, 2000).

La biorremediación es un proceso biotecnológico en el que se emplean seres vivos como bacterias, hongos, plantas superiores, macroalgas y microalgas, para remover y recuperar contaminantes del medio ambiente. Dicho tratamiento a partir de microorganismos, se puede realizar mediante cultivos microbianos, puros o mixtos, con potencial de biotransformar, bioacumular o bioadsorber los contaminantes (Garza & Coto, 2005), la biorremediación o biorrecuperación también se puede definir 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 (Levin & Gealt, 1997, Cortón & Viale, 2006); técnica alternativa a las tecnologías industriales, que permite recuperar áreas contaminadas y tratar residuos industriales y domiciliarios, mediante el uso de plantas y microorganismos (Madigan et al, 2003), es por esto que existe un gran interés por el estudio y utilización de microorganismos como las microalgas y bacterias, las cuales se consideran potencialmente útiles en la biorremediación de compuestos orgánicos e inorgánicos (Mallick, 2002, Suresh & Ravishankar, 2004).

Las técnicas modernas de biorremediación utilizan microorganismos para reducir, eliminar o inmovilizar contaminantes (López et al, 2001), para que estos microorganismos puedan crecer y desarrollar sus funciones vitales necesitan un aporte de nutrientes, básicamente carbono, nitrógeno y fósforo; así como donantes y aceptores de electrones (Van Cauwenberghe & Roote, 1998).

La ficorremediación, corresponde a la biorremediación que implementa el uso de macroalgas o microalgas, para la eliminación o biotransformación de

contaminantes (Olguin, 2003), las microalgas se han utilizado desde la década de los 60 en diferentes países para el tratamiento biológico terciario de aguas municipales, en canales de aguas poco profundas (Shelef, 1979), actualmente el uso de las microalgas se ha incrementado y se emplea en tratamientos terciarios para descontaminar aguas con metales pesados o con alto contenido de nutrientes y compuestos xenobióticos y también para secuestrar CO<sub>2</sub> (Olguin, 2003), son potencialmente útiles en procesos de descontaminación de aguas residuales (De-Bashan & Bashan, 2010), efluentes industriales (Oswald, 1998) y con potencial descontaminación y recuperación de metales pesados (Greenee & Bedell, 1990).

Dentro de la familia Lemnaceae existen cuatro generos (*Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* & *Wolffiella*) y 37 especies han sido identificadas hasta ahora, incluyendo la lenteja de agua *Lemna minor* (Iram et al, 2012, Rahmani & Stenberg, 1999, Jafari, 2011). La lenteja de agua es una macrófita acuática flotante, simple y pequeña, que posee estructuras verdes individuales (frondas) que flotan, es una planta ubicua con distribución en todo el mundo, creciendo en una variedad de climas y en la superficie de aguas dulces y salobres ricas en nutrientes, así que todas estas características permiten un fácil aislamiento y reproducción en el laboratorio (Zimmo et al, 2005, Rahmani & Stenberg, 1999). Las aplicaciones de la lenteja de agua en el tratamiento de aguas residuales han sido muy efectivas en la remoción de nutrientes, sales solubles, materia orgánica, metales pesados, eliminación de sólidos suspendidos, exceso de algas, contaminantes de aguas residuales de refineries de petróleo, de industrias de galvanoplastia y granjas porcinas, convirtiéndose así en bioindicadores del agua (Iram et al, 2012, Azeez & Sabbar et al, 2012, El-Kheir et al, 2007, Arroyave, 2004, Horvat et al, 2007, Oporto et al, 2006) y en definitiva, el uso de plantas acuáticas como *Lemna*, representa tecnologías alternativas y seguras, fáciles de manejar que tienen bajo capital y costos operarios (Obek & Hasar, 2002)

Las microalgas representan indicadores sensibles de cambios ambientales, como la base de la mayoría de los ecosistemas marinos y dulceacuícolas (Afkar et al, 2010). Muchas especies de *Chlorella* (Chlorophyceae) han sido usadas para el tratamiento de aguas residuales, eliminando residuos tóxicos, fosforo, compuestos nitrogenados, metales pesados y exceso de nutrientes que podrían ocasionar eutroficación (Mamun et al, 2012, Valderrama et al, 2002), estas algas pueden ser usadas en aguas residuales tanto industriales como domesticas (Kaplan et al, 1995). Se empleó a *Chlorella vulgaris* para biorremediación de aguas residuales de la industria textil, mostrando eficiencia en la remoción del color en el agua, patrón considerado para medir la calidad del agua y su contaminación (Lim et al, 2010), también se ha usado para el tratamiento de aguas residuales de la industria licorera, ofreciendo una alternativa simple y económica (Travieso et al, 2008).

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de biorremoción de solidos totales, suspendidos y disueltos por parte de *Lemna minor* y *Chlorella sp.* Asimismo el efecto de estos sólidos en el crecimiento de *L. minor* y *Chlorella sp*; y estimación de los sólidos suspendidos fijos y volátiles y así evaluar la capacidad de *Chlorella sp* en estado libre, de biorremover sólidos.

## 1. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos fueron desarrollados en un laboratorio ubicado en el Invernadero de la Escuela de Biología y en el laboratorio de Biomasa de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander.

### 1.1 Caracterización del agua.

El agua residual fue suministrada por la empresa “Administramos y Transportamos A.T S.A.S”, y su origen una empresa termoeléctrica colombiana situada en la ciudad de Santafé de Bogotá (Cundinamarca); debido a normas internas y políticas de privacidad, la empresa desea la reserva su nombre. Dichas muestras fueron caracterizadas en el laboratorio químico de consultas industriales (LQCI), en la escuela de química de la Universidad Industrial de Santander, (Tabla 1).

**Tabla 5. Caracterización del agua residual.**

Parámetro	Valoración	Método
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
Nitrógeno Total (mg N/L)	0,370	Titrimétrico – Kjeldhal – SM 4500 N <sub>T</sub>

Se usaron contenedores en acrílico de dimensiones: largo: 62,5 cm; Alto: 50 cm; Ancho: 40 cm. A los cuales se les acopló un sistema de aireación por burbujeo (tubo-difusor) que permite mejorar la oxigenación del agua, así, como la distribución de los nutrientes y evitar la sedimentación de las células. Se usó iluminación artificial provista por lámparas fluorescentes de luz blanca de 156  $\mu\text{mol}\cdot\text{quanta}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ , fotoperiodo 12h:12h horas luz-oscuridad.

Los experimentos se realizaron de manera autotrófica, en un cultivo con los nutrientes aportados por el medio bold basal (anexo 1.) en el caso del control, y en

un medio con aguas residuales procedentes de una central térmica en el caso de los tratamientos, para contrastar las respuestas de la planta (*Lemna minor*) y las microalgas (*Chlorella sp.*) en ambos medios de cultivo.

## 1.2 Evaluación de los Sólidos

Los sólidos totales se determinaron de acuerdo con el “*standard methods for the examination of water and wastewater*” (APHA, 1998), y siguiendo las normas de *American Public Health Association, American Water Works Association, y Water Environment Federation*. Se tomaron muestras de 50 mL medidas con probeta graduada y vertidas en vasos de precipitados, por triplicado de cada uno de los reactores, posteriormente se llevaron al horno, inicialmente a una temperatura de 98°C para evitar ebullición y pérdida de la muestra por salpicaduras. Una vez evaporada la muestra, se mantenía una temperatura de 105°C durante una hora. Se trasladaban a un desecador durante una hora y finalmente se pesaban hasta obtener un peso constante o hasta que la pérdida de peso fuese menor que el 4% del peso previo.

$$ST \text{ mg/L} = \frac{(A - B) * 1000}{\text{volumen de muestra (mL)}} * 1000$$

Dónde:

A= Peso del residuo seco + peso del vaso de precipitado en g

B= Peso del vaso de precipitado en g

Los sólidos suspendidos totales se determinaron de acuerdo con el “*standard methods for the examination of wáter and wastewater*” (APHA, 1998), y siguiendo las normas de *American Public Health Association, American Water Works Association, y Water Environment Federation*. Se tomaron muestras de 50 mL medidas con probeta graduada y vertidas en vasos de precipitados, en triplicado en cada uno de los reactores. Antes del proceso de filtración, los filtros de fibra de vidrio junto con las cajas de Petri que los contenían fueron previamente

preparados; secados en el horno, desecados y pesados. Se ensablo un sistema para la filtración de las muestras que utilizaba una bomba de succión, conectada a un matraz con salida lateral cuya boca estaba sellada al vacío con un corcho que atravesaba un embudo de vidrio que contenía el filtro de fibra de vidrio sobre el cual se vertía la muestra para obtener de esta forma los sólidos suspendidos que yacían en el filtro, a continuación se removía con unas pinzas y se trasladaba a una caja de Petri para ser secado en el horno a 105°C durante 1 hora, Se trasladaban a un desecador durante una hora y finalmente se pesaban hasta obtener un peso constante o hasta que la pérdida de peso fuese menor que el 4% del peso previo. Para evaluar los sólidos suspendidos fijos y volátiles, se tomaba la muestra y se llevaba a un horno de mufla a una temperatura de 550°C durante 15 minutos, se desecaba y pesaba. El remanente que queda después de la incineración corresponde a los sólidos suspendidos fijos (que también se denominó los sólidos suspendidos totales reales, REAL SST) y el diferencial entre estos y los suspendidos totales son los sólidos suspendidos volátiles.

$$SST \text{ mg/L} = \frac{(A - B) * 1000}{\text{volumen de muestra (mL)}} * 1000$$

$$SSF \text{ mg/L} = \frac{(A - B) * 1000}{\text{volumen de muestra (mL)}} * 1000$$

$$SSV \text{ mg/L} = SST - SSF$$

También se pueden calcular los SSV con esta ecuación

$$SSV \text{ mg/L} = \frac{(A - C) * 1000}{\text{volumen de muestra (mL)}} * 1000$$

Dónde:

A= peso del filtro + caja de Petri + residuo seco a 105°C en g

B= peso del filtro seco + caja de Petri en g

C= peso del filtro + caja de Petri + el residuo calcinado a 550°C en g

Los sólidos suspendidos totales se determinaron de acuerdo con el “*standard methods for the examination of wáter and wastewater*” (APHA, 1998), y siguiendo las normas de *American Public Health Association*, *American Water Works Association*, y *Water Environment Federation*. Básicamente son el resultado del procedimiento anterior, el filtrado depositado en el matraz de salida lateral era trasladado nuevamente al vaso de precipitado, posteriormente se llevaba cada muestra al horno, inicialmente a una temperatura de 98°C para evitar ebullición y pérdida de la muestra por salpicaduras. Una vez evaporada la muestra, se mantenía una temperatura de 105°C durante una hora. Se trasladaban a un desecador durante una hora y finalmente se pesaban hasta obtener un peso constante o hasta que la pérdida de peso fuese menor que el 4% del peso previo.

$$SDT \text{ mg/L} = ST - SST$$

### **1.3 Parámetros de crecimiento para *Lemna minor***

#### **1.3.1 Cálculo del Área Foliar**

Se evaluó el área foliar (cm<sup>2</sup>) cada cuatro días (durante 16 días), a partir de la toma de 25 plantas, por reactor; muestras a las cuales se les registraron imágenes mediante escáner (Canon, PIXMA MP190); imágenes que fueron posteriormente procesadas por el programa ImageJ 1.45 (Image Processing and Analysis in Java) (Rasband, 2011).

#### **1.3.2 Medición de Clorofila a y Carotenos**

Se determinó la clorofila de acuerdo a Lichtenthaler (1987), utilizando etanol como agente extractante. Las muestras fueron centrifugadas y leídas en un espectrofotómetro de luz visible (Spectroquant® Pharo 300, Merck) después de aplicar el siguiente procedimiento. Se tomaron muestras por triplicado, entre 20 y

22 hojas de Lemna, de cada unidad experimental, de ambos tratamientos y del control 2 (agua destilada con Lemna), las cuales luego de hacer el debido procedimiento se obtuvo un peso seco promedio de 0.0019 g (PS). Posteriormente cada muestra se llevó a un mortero, con el fin de triturar las hojas, se macero durante 1 minuto luego agregamos 4 mL de etanol mediante una pipeta graduada de 10 mL y se procedió a macerar durante otro minuto. Luego se almacena esta mezcla en un tubo de ensayo Falcón, seguidamente se adicionaron otros 4 mL a través de la misma pipeta al mortero para recuperar la mayor cantidad de biomasa. Adicionamos éste volumen al tubo de ensayo Falcón, resultando muestras de 8 mL cada una. Esta muestra fue recubierta con papel aluminio para evitar el contacto con la luz, y se llevó a refrigeración durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, estas muestras fueron llevadas a centrifugar durante 20 minutos a 3400 rpm. Luego el sobrenadante se vació en una celda para la respectiva lectura en el espectrofotómetro a 648 nm y 664 nm.

### **1.3.3 Peso Fresco y Peso Seco**

Se tomaron 30 plantas de cada reactor y se pesaron por triplicado para obtener el peso fresco, posteriormente cada muestra se llevó al horno a 105°C durante 1 hora y luego se deseco para finalmente ser pesadas y obtener así el peso seco. Estas variables fueron evaluadas cada 4 días.

## **1.4 Parámetros de crecimiento para *Chlorella sp***

### **1.4.1 Medición de Clorofila a y Carotenos**

Se determinó la clorofila utilizando etanol como agente extractante (Wiley., 2005). Las muestras fueron centrifugadas y leídas en un espectrofotómetro marca (Spectroquant® Pharo 300, Merck), después de aplicar el siguiente procedimiento:

Se tomaron muestras por triplicado, 10 ml de cada unidad experimental a través de una pipeta graduada de 25 mL, de ambos tratamientos y del control 2 (agua destilada con *Chlorella*). Esta etapa del procedimiento se realizó en horas tempranas de la noche para evitar complicaciones con la luz solar. Estas muestras fueron recolectadas en tubos de ensayo Falcón y llevadas a centrifugar durante 20 minutos a 3400 rpm. Luego se vació el sobrenadante y se le agrego a cada muestra 3 ml de etanol a través de una pipeta graduada de 10 mL, para disolver la clorofila. Cada muestra fue sometida a baño maría durante 10 minutos a temperatura aproximada de 90°C. Posteriormente se aforo cada muestra a 5 ml con etanol y se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 3400 rpm. Luego el sobrenadante se vació en una celda para la respectiva lectura en el espectrofotómetro a 648 nm y 664 nm (Wiley., 2005).

#### **1.4.2 Peso Seco**

Esta variable fue evaluada a partir de 3 mL de volumen tomado de cada uno de los reactores, cada muestra fue llevada al horno a 105°C durante 1 hora, se deseco y peso por triplicado para obtener el peso seco.

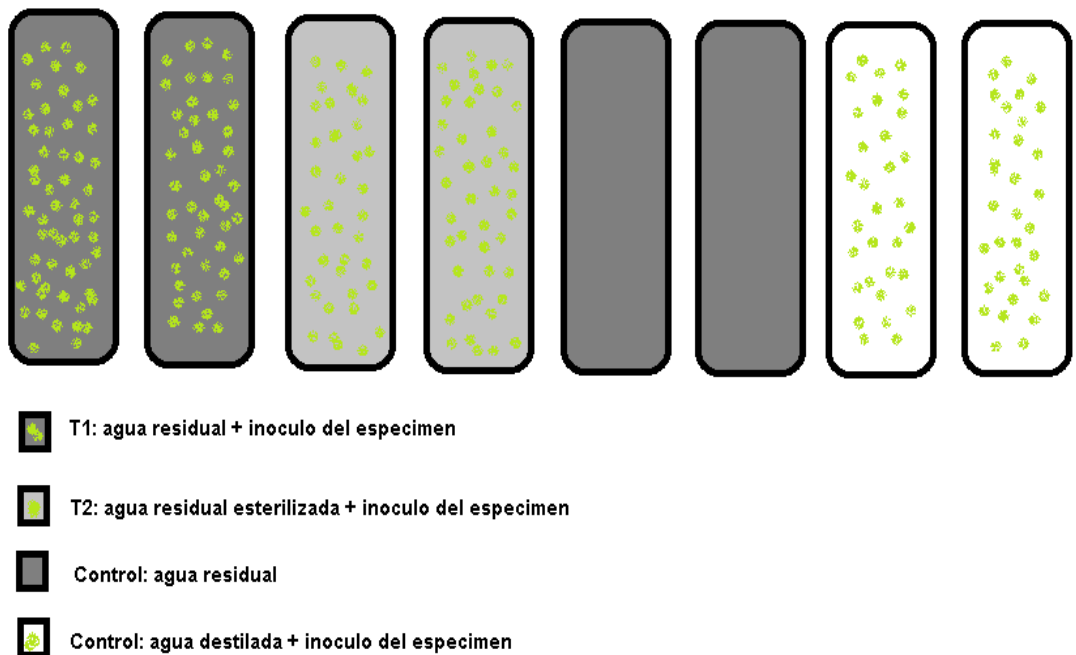
#### **1.4.3 Análisis Estadístico**

Debido a que algunos de las variables no presentaron homogeneidad de varianzas y/o distribución normal, y para tener uniformidad en el análisis estadístico, se realizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, para cada experimento independientemente, evaluando diferencias significativas entre las muestras y las variables evaluadas (Sokal y Rohlf, 1979; Zar, 1984). Se aplicó la prueba a posteriori de múltiples comparaciones de valores de p. Se utilizó el software SPSS (versión 10,0 para Windows).

#### 1.4.4 Experimento y Tratamientos

Es un sistema con dos ciclos consecutivos de biorremediación que inicia con la inoculación de *L. minor*, posteriormente con *Chlorella sp.* Cada uno se expuso al agua residual durante 16 días, los reactores se dispusieron por duplicado para cada uno de los tratamientos, es decir, se tenían dos unidades experimentales por tratamiento, en la Figura 1 se muestra el montaje y disposición de los contenedores en el experimento.

Figura 1. **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. En el ciclo inicial, el espécimen inoculado es *L. minor* y en el ciclo final el inóculo es *Chlorella sp.*



## 2. RESULTADOS

Se encontraron diferencias significativas en todos los parámetros, en una o en las dos fuentes de variación evaluadas. Para *Lemna minor*, se encontraron diferencias significativas en los Sólidos Suspendidos Totales, en las dos fuentes de variación, mientras que en los parámetros de Sólidos Disueltos Totales (SDT) y Sólidos Totales (ST) en el tiempo que no se presentaron diferencias.

Tabla 6. Resultados del Kruskal-Wallis de los sólidos evaluados para *L. minor* en las variables independientes; tiempo (días) y tratamiento, se muestran los valores del test estadístico (H) y los valores de p cuyos valores en rojo indican las diferencias significativas.

Parámetro	Fuente de Variación	H	P
ST	Tiempo(Días)	7,506546	0,0574
	Tratamiento	49,28964	0,0000
SST	Tiempo(Días)	20,68428	0,0001
	Tratamiento	33,38938	0,0000
SDT	Tiempo(Días)	1,387038	0,7086
	Tratamiento	48,20274	0,0000

### 2.1 Eficiencia de Biorremoción de Sólidos por parte de *Lemna minor*

Se encontraron diferencias significativas en la alteración de los sólidos totales (ST) y en los sólidos disueltos totales (SDT), frente a los tratamientos (Tabla 2); los sólidos suspendidos totales (SST), exhibieron diferencias significativas en el tiempo y entre tratamientos (Tabla 1). Mostrando disminuciones en las concentraciones de los diferentes tipos de sólidos (Figura 2.) y aumentos en los porcentajes de reducción de cada uno de ellos, principalmente en SST (Figura 3.).

Figura 2. Comparación de las concentraciones de los Sólidos Totales (ST), Sólidos Suspendidos Totales (SST) y Sólidos Disueltos Totales (SDT) entre los tratamientos, a través del tiempo, en el ciclo inicial con *L. minor*.

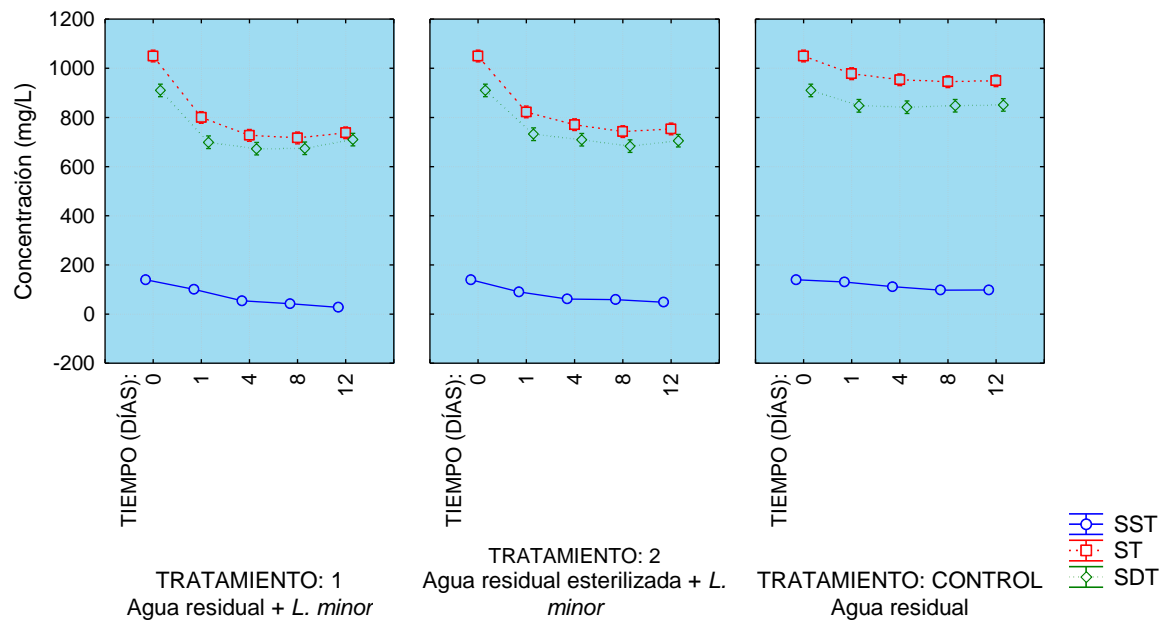
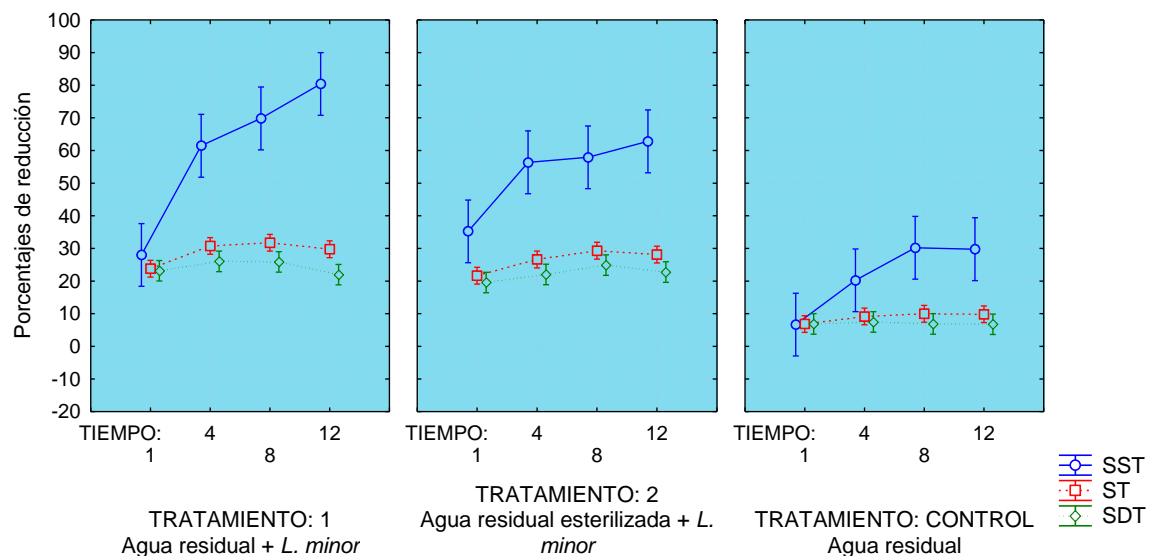


Figura 3. Comparación de los porcentajes de reducción de los Sólidos Totales (ST), Sólidos Suspendidos Totales (SST) y Sólidos Disueltos Totales (SDT) entre los tratamientos a través del tiempo, en el ciclo inicial con *L. minor*.



## 2.2 Eficiencia de Biorremoción de Sólidos por parte de *Chlorella sp*

En los sólidos suspendidos fijos (REAL SST) se encontraron diferencias significativas tanto en el tiempo y tratamiento (Tabla 3.), mostrando una disminución muy notable en las concentraciones, sobre cero, con respecto al control, sin embargo, el mismo peso de las microalgas incremento la concentración de los demás tipos de sólidos, en especial los ST y SST (Figuras 4 y 5).

Tabla 7. Resultados del Kruskal-Wallis de los sólidos evaluados para *Chlorella sp* en las variables independientes; tiempo (días) y tratamiento, se muestran los valores del test estadístico (H) y los valores de p cuyos valores en rojo indican las diferencias significativas.

Parámetro	Fuente de Variación	H	P
ST	Tiempo(Días)	2,688347	0,4422
	Tratamiento	58,58930	0,0000
SST	Tiempo(Días)	7,275551	0,0636
	Tratamiento	36,01843	0,0000
Real SST (SSF)	Tiempo(Días)	14,63720	0,0022
	Tratamiento	47,78997	0,0000
SSV	Tiempo(Días)	5,088501	0,1654
	Tratamiento	47,42030	0,0000
SDT	Tiempo(Días)	1,333844	0,7211
	Tratamiento	57,15734	0,0000

Figura 4. Comparación de las concentraciones de Sólidos Suspendedos Totales (SST), solidos suspendidos volátiles (SSV) y los sólidos suspendidos fijos (SSF), que representan el valor real de los Sólidos Suspendedos, entre los tratamientos a través del tiempo, en el ciclo final con *Chlorella sp*

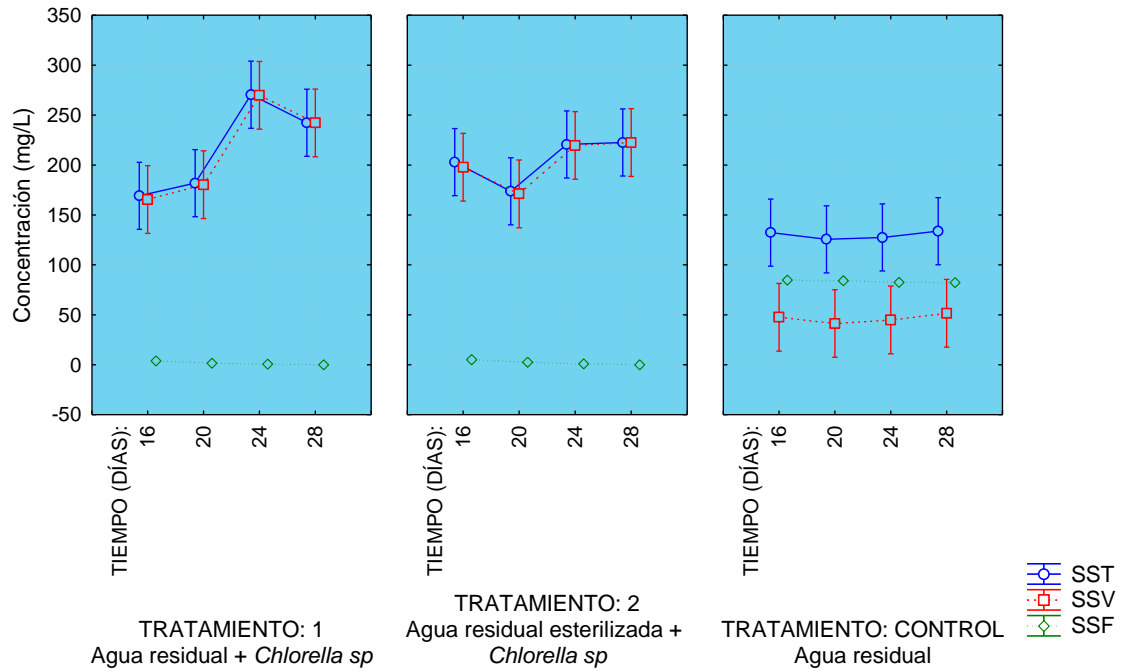
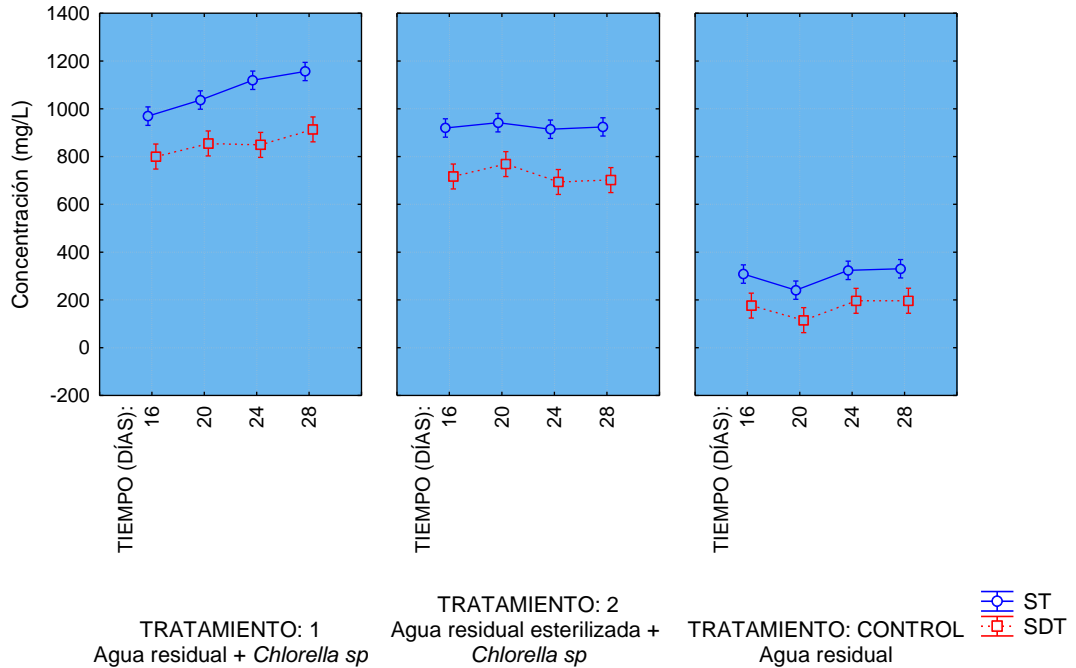


Figura 5. Comparación de las concentraciones de los Sólidos Totales (ST) y Sólidos Disueltos Totales (SDT) en función del tiempo, en el ciclo final con *Chlorella sp*



### 2.3 Efecto de los Sólidos en el crecimiento de *Lemna minor*

Se encontraron diferencias significativas en todos los parámetros de crecimiento, en las dos fuentes de variación; tiempo (días de muestreo) y tratamiento, como se muestra en la tabla 4.

Tabla 8. Resultados del Kruskal-Wallis de los parámetros de crecimiento evaluados para *L. minor* en las variables independientes; tiempo y tratamiento, se muestran los valores del estadístico (H) y los valores de p cuyos valores en rojo indican las diferencias significativas.

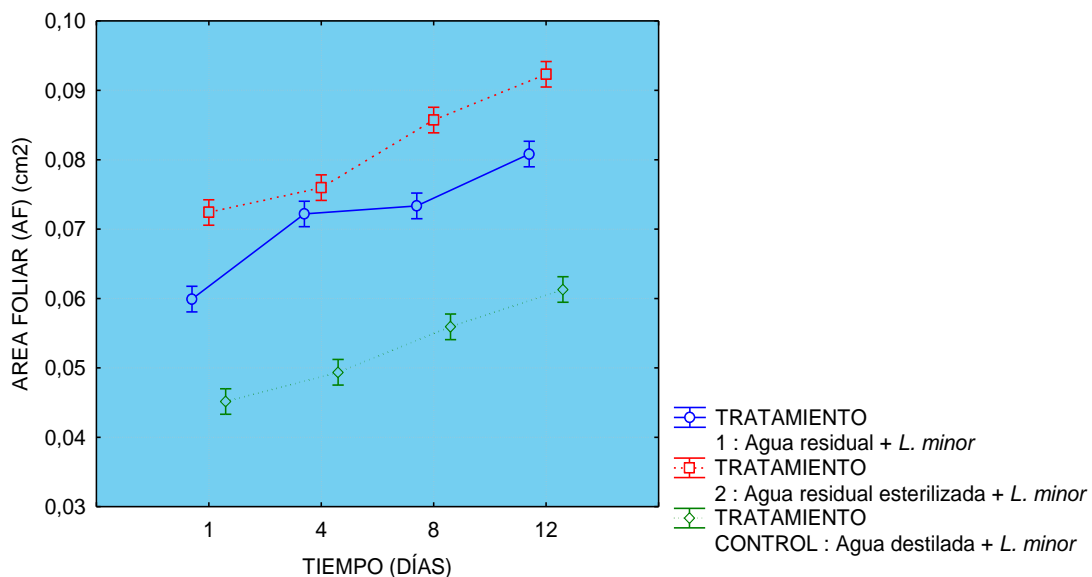
Parámetro	Fuente de Variación	H	P
Área foliar	Tiempo(Días)	117,2136	0,000
	Tratamiento	368,9129	0,000
Peso fresco	Muestreo(Días)	39,75052	0,0000
	Tratamiento	26,76290	0,0000

<b>Peso seco</b>	Muestreo(Días)	25,63879	0,0000
	Tratamiento	9,030744	0,0109
<b>Clorofila a</b>	Tiempo(Días)	31,00373	0,0000
	Tratamiento	9,420352	0,0090
<b>Carotenos</b>	Tiempo(Días)	18,50411	0,0003
	Tratamiento	15,09074	0,0005

### 2.3.1 Área Foliar

Hay un incremento en el área foliar a través del tiempo en los dos tratamientos en comparación con el control, siendo el tratamiento 2 el medio en el que más aumento tuvo el área foliar (Figura 6.). El incremento del área foliar en el tiempo se puede relacionar con la reducción simultanea de sólidos (Figura 2.).

Figura 6. Crecimiento del Área Foliar en cada uno de los tratamientos a través del tiempo, en el ciclo inicial con *L. minor*.

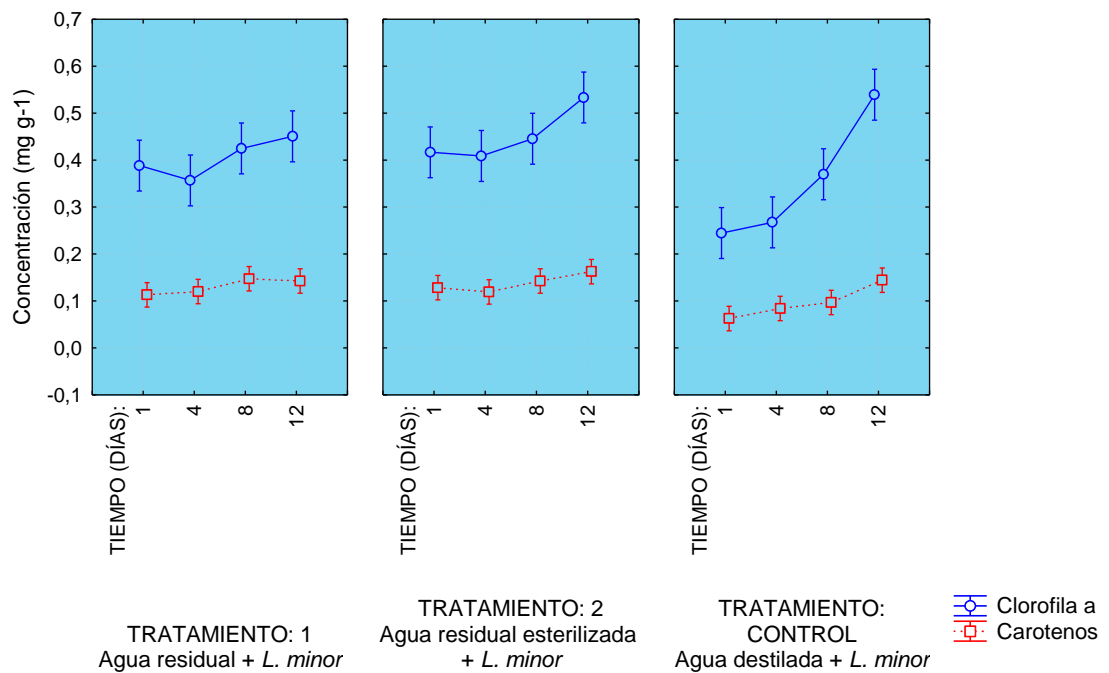


### 2.3.2 Clorofila a y Carotenos

Los pigmentos fotosintéticos (Clorofila A y Carotenos), se incrementaron en el tiempo, tanto en los tratamientos como en el control, durante los días 1 – 8 se

observa la mayor cantidad de pigmentos en los tratamientos con agua residual, respecto al control (Figura 7.).

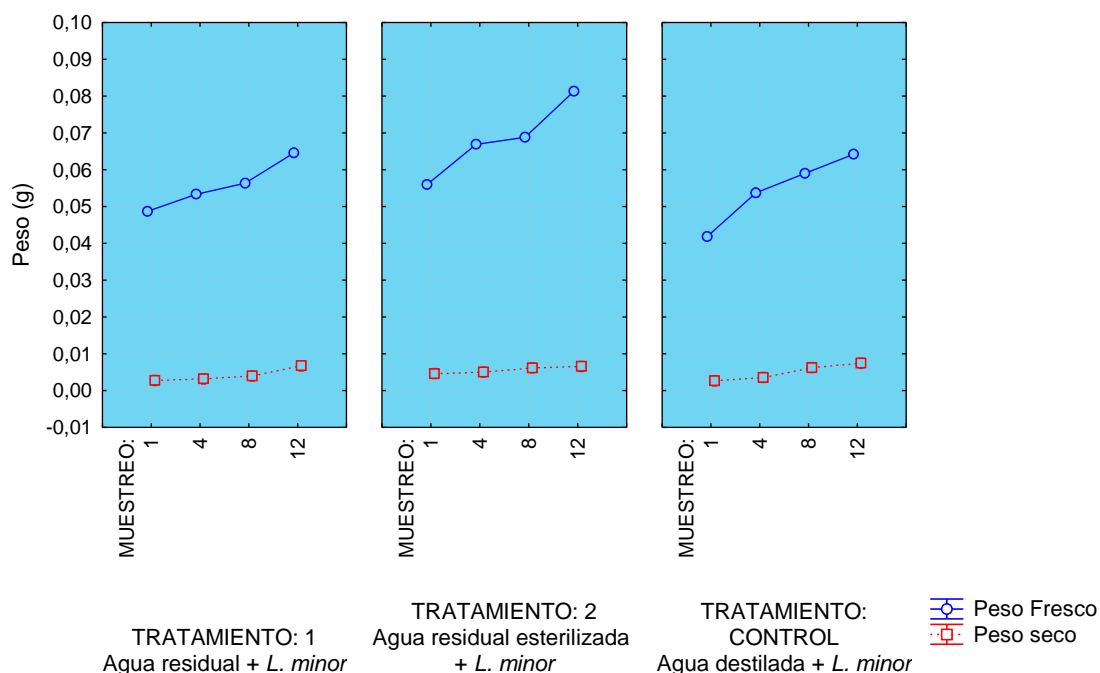
Figura 7. Comparación de las cantidades de Clorofila A y Carotenos (mg g<sup>-1</sup>) entre los tratamientos a través del tiempo, en el ciclo inicial con *L. minor*.



### 2.3.3 Peso Fresco y Peso Seco

Estas variables presentaron diferencias tanto en el tiempo como en el tratamiento (Tabla 4.), se observa un incremento en ambos parámetros, resultados que también se relacionan con el incremento del área foliar, ya que si el organismo estaba creciendo, su peso también se incrementó (Figura 8.).

Figura 8. Comparación de las cantidades de peso fresco y peso seco (g) entre los tratamientos a través del tiempo, en el ciclo inicial con *L. minor*.



## 2.4 Efecto de los Sólidos en el crecimiento de *Chlorella sp*

### 2.4.1 Clorofila a y Carotenos

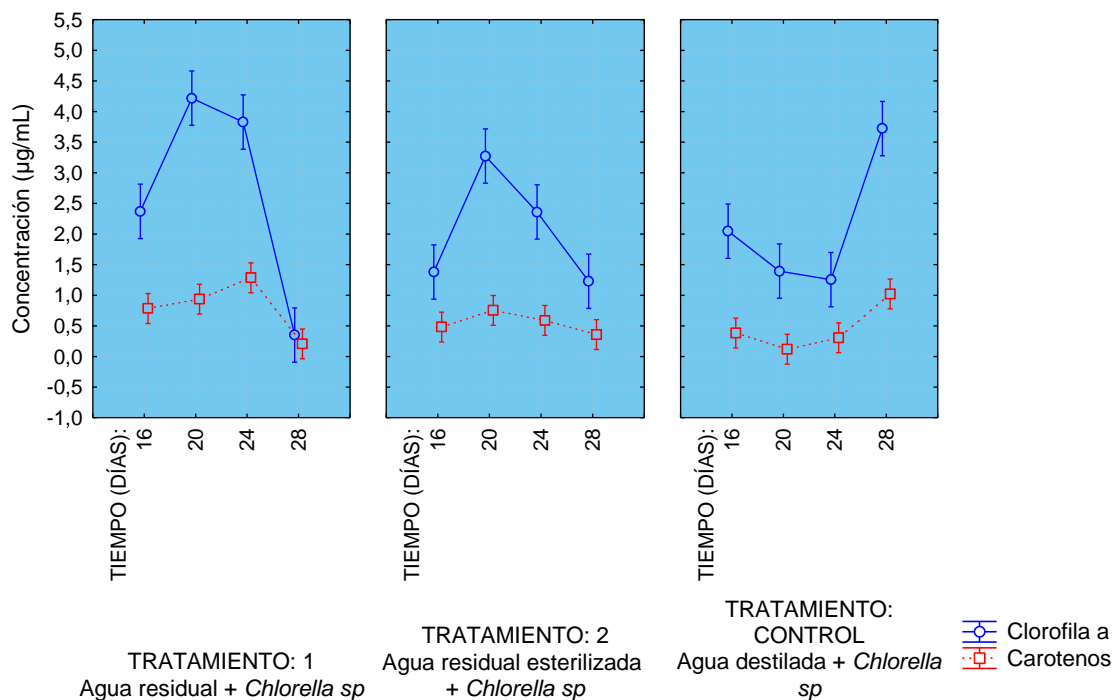
En la clorofila A se aprecian diferencias en el tiempo y en los Carotenos en el tratamiento (Tabla 5.), mostrando una reducción de los pigmentos a través del tiempo en los tratamientos con agua residual con respecto al control (Figura 9.).

Tabla 9. Resultados de Kruskal-Wallis para los parámetros de crecimiento evaluados para *Chlorella sp* en las variables; tiempo (días) y tratamiento, se muestran los valores del test estadístico (H) y los valores de p cuyos valores en rojo indican las diferencias significativas.

Parámetro	Fuente de Variación	H	P
Clorofila a	Tiempo(Días)	9,908871	0,0194
	Tratamiento	2,514131	0,2845
Carotenos	Tiempo(Días)	0,633780	0,8887

	Tratamiento	6,285727	0,0432
<b>Peso seco</b>	Tiempo(Días)	99,70961	0,0000
	Tratamiento	19,31284	0,0001

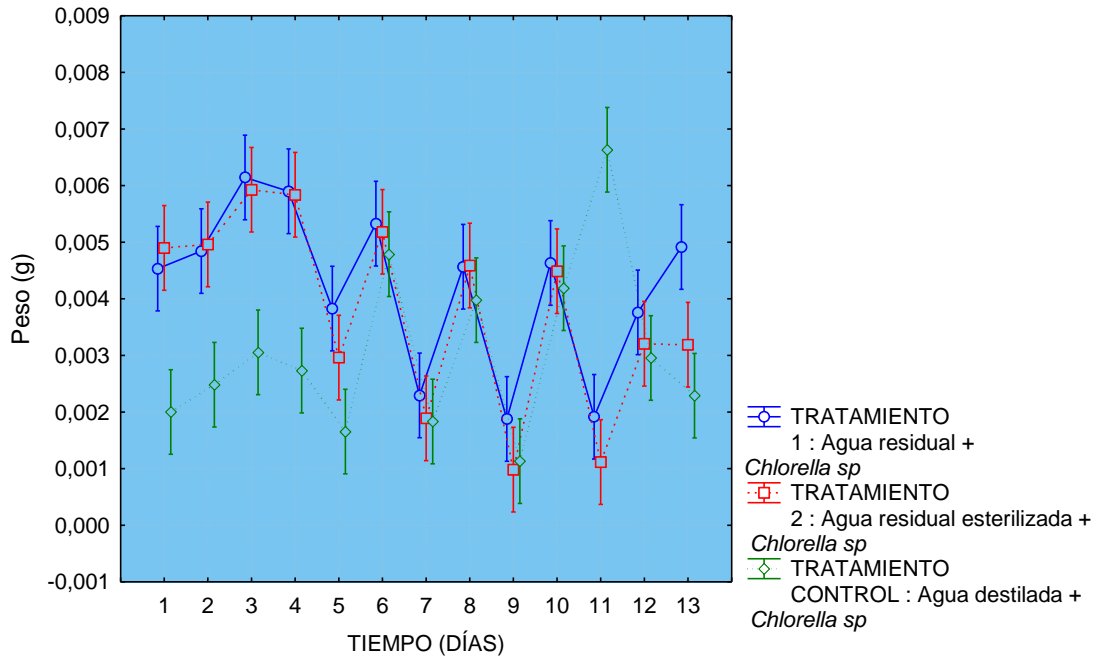
Figura 9. Comparación de las cantidades de Clorofila A y Carotenos ( $\mu\text{g/mL}$ ) entre los tratamientos a través del tiempo, en el ciclo final con *Chlorella sp.*



### 2.4.2 Peso Seco

En este parámetro se observaron diferencias significativas en las dos fuentes de variación (Tabla 1.), la tendencia de crecimiento es muy fluctuante, con días de incremento en el peso seco y otros de disminución (Figura 10.).

Figura 10. Comparación de las cantidades de peso seco en los tratamientos a través del tiempo, en el ciclo final con *Chlorella sp.*



### 3. ANALISIS DE LOS RESULTADOS

#### 3.1 Eficiencia de Biorremoción de Sólidos por parte de *Lemna minor*

Las macrófitas son capaces de remover materia orgánica y sólidos suspendidos (Karpiscak *et al*, 1994). La mayoría de plantas del genero *Lemna sp.* son capaces de resistir una concentración extrema de contaminantes por el secuestro y la compartimentalización en ellas dentro de sus organelos celulares, así mismo, las respuestas adaptativas que modulan la dinámica fisiológica juegan un papel importante en la capacidad de *Lemna* a sobrevivir a condiciones extremas en el ambiente; esto es ventajoso para el uso de *Lemna sp.* como agentes de biorremediación (Mkandawire & Dudel, 2007) y *Lemna minor* no fue la excepción, ya que los diferentes tipos de sólidos se encontraban en concentraciones considerables en el tiempo inicial mostrando disminución a través del tiempo hasta

el día 16, comprobándose así su capacidad de biorremediar aguas residuales de centrales térmicas para mitigar la contaminación de las cenizas de carbón que estas producen.

También cabe resaltar la eficiencia y capacidad de secuestro según el porcentaje de reducción de los sólidos suspendidos totales (Abou el-kheir et al, 2007) cuyos valores obtenidos están entre el 70% y 90% en el tratamiento 1 que fue mayor a los porcentajes obtenidos en el tratamiento 2 cuyos valores están entre el 55% y 70%, lo que indica que muy probablemente que algunos de los microorganismos que no fueron esterilizados en el tratamiento 1 también sean agentes biorremediantes (Figura 2.), por otro lado la reducción de los sólidos totales y los sólidos disueltos totales fue menor, 30% y 20% respectivamente, una posible explicación es que tener concentraciones en mg/L más altas (Figura 1.) disminuye el porcentaje de biorremoción o que *Lemna minor* tiene una mejor asimilación de los sólidos suspendidos que del resto.

Los resultados de eficiencia de *Lemna* en la recolección de residuos contaminantes indican que la presencia de esta macrófita fue un importante elemento para la remoción de contaminantes en las aguas residuales (Iram et al, 2012). En condiciones naturales todas las corrientes de agua llevan algunos sólidos suspendidos (Ryan, 1991), sin embargo, si las concentraciones se incrementan a través de, por ejemplo, las perturbaciones antrópicas, esto puede conducir a alteraciones en las propiedades físicas, químicas y biológicas del cuerpo de agua, alteraciones físicas que incluyen la reducción de la penetración de la luz, los cambios de temperatura, y el relleno de canales y reservorios cuando los sólidos son depositados (Bilotta & Brazzer., 2008), lo que representa muchos problemas en los ecosistemas de un fuerte impacto ambiental, como la reducción de la productividad primaria desde un 13% hasta un 50% según la concentración

de sólidos suspendidos presentes en el agua (Lloyd et al., 1987; Van Nieuwenhuysse & LaPierriere., 1986). *Lemna minor* forma parte de un buen sistema para el tratamiento de aguas residuales de centrales térmicas porque representa eficiencia, fácil uso y economía.

### **3.2 Eficiencia de Biorremoción de Sólidos por parte de *Chlorella sp***

El uso de algas también representa bajo costo y efectividad en el tratamiento para limpiar aguas contaminadas (Oswald, 2003), aunque evaluar su efectividad se vio en parte afectada debido a su uso libre que genero ruido en los resultados, de esto modo se incrementaron todos los sólidos que contrastan con valores de concentración más altos en el tratamiento 1 y 2 con respecto al control, y se puede decir que en el tratamiento 1, los microorganismos no esterilizados hacen mayor la cantidad de sólidos presentes. Por esta razón, en el caso de los sólidos suspendidos totales (SST), se evaluaron los sólidos suspendidos volátiles (SSV) y los sólidos suspendidos fijos también llamados (REAL SST) sólidos suspendidos totales reales, para saber realmente si hubo secuestro de este tipo de sólidos. Como se observa en la figura 3, efectivamente hubo remoción casi del 100% de los sólidos suspendidos totales reales, llegando a concentraciones muy cercanas a cero en el tratamiento 1 y 2 mientras que en el control, estos valores están muy cercanos a los 100 mg/L y permanecen constantes a través del tiempo.

Con respecto a los sólidos suspendidos volátiles se sabe que son la fracción que se volatiliza a 550°C y suelen ser considerados en algunos casos como las concentraciones de sólidos biológicos tales como bacterias, algas y protistas por lo que fueron monitoreados para saber la biomasa producida por *Chlorella sp* y demás microorganismos durante el estudio (Mamun et al, 2012). La remoción de materia orgánica de la microalga esta probablemente camuflada por el crecimiento

celular de la misma, en un estanque oxigenado, la mayoría de los sólidos suspendidos son en realidad comunidades de microalgas (Metcalf & Eddy, 1995)

El mejor tratamiento para un eficiente sistema de biorremediación es parecido a el tratamiento 1 según Valderrama et al, (2002), mientras la población bacteriana degrada materia orgánica que forman parte de los microorganismos del agua residual no esterilizada, las macrófitas eliminan materia orgánica suspendida por secuestro, captura, floculación y precipitación de partículas sólidas, la microalga absorbe moléculas (nutrientes y toxinas) liberadas durante los otros procesos. Así, hay una ventaja de combinar algunos organismos, en tándem, para tratar aguas recalcitrantes. Además especies de *Chlorella* pueden remover residuos tóxicos de aguas residuales (Smets & Rittmann, 1990).

### **3.3 Efecto de los Sólidos en el crecimiento de *Lemna minor***

#### **3.3.1 Área Foliar**

A medida que se fue incrementando en el tiempo el área foliar, se fue reduciendo simultáneamente la presencia de sólidos (Figuras 6 y 2), ya que el aumento del área foliar, incrementa la superficie de absorción y consumo de sólidos. Según Vasseur & Aarssen, (1992) unas pocas especies de *Lemna* han demostrado plasticidad fenotípica y es evidente que *Lemna minor* está dentro de estas especies. La plasticidad en la mayoría de *Lemna sp.* ha sido observada a niveles morfológicos como en la tasa de producción de fronda (Crawford et al, 2001). En el tratamiento 2 el incremento del área foliar fue mayor en comparación con el tratamiento 1 probablemente por la competencia de los nutrientes con los microorganismos no esterilizados del tratamiento 1. El cálculo del área foliar es un parámetro comparable a nivel morfológico que evalúa la capacidad de la macrófita

para crecer en aguas residuales de centrales térmicas y se comprobó que los sólidos no afectan el crecimiento del área foliar en la planta.

### **3.3.2 Clorofila a y Carotenos**

El contenido de pigmentos es uno de los biomarcadores comúnmente usados para evaluar la toxicidad (Mohan & Hosetti, 1999, Radic et al, 2009), la toxicidad del agua no afectó la producción de pigmentos (Figura 7.) y por ende el crecimiento, ya que hubo incremento en la Clorofila A mostrando tolerancia a la contaminación y sólidos del agua.

Los carotenoides están involucrados en la protección de la clorofila pero ellos también sirven como antioxidantes para eliminar y neutralizar los radicales libres y reducir el daño a la membrana celular y ADN (Hou et al, 2007, Kanoun-Boulé et al, 2009), pigmentos que también incrementaron.

### **3.3.3 Peso Fresco y Peso Seco**

Estas dos variables están estrechamente relacionadas con el aumento del área foliar, debido al desarrollo de más tejido vegetal en las frondas de la planta lo que resulta en una mayor cantidad de peso fresco y peso seco (Figura 8.), lo que confirma la tolerancia de *Lemna minor* a la contaminación y sólidos del agua. El peso fresco fue mayor en el tratamiento 2 en comparación al tratamiento 1 y el control, datos respaldados por el área foliar que también fue mayor en el tratamiento 2, por la no competencia de nutrientes puesto que la esterilización elimina la gran mayoría de los microorganismos en el agua.

Algunos estudios han mostrado que la mayoría de especies de *Lemna* retienen menos del 3% de su peso en biomasa después de secado (Landesman, 2000; Mkandawire 2005). Esto significa que el mayor porcentaje de contenido de *Lemna* es agua y la alta bioacumulación de contaminantes reportados en la literatura es atribuido a la pérdida de agua la cual deja una relación contaminantes a biomasa de *Lemna* muy alta (Mkandawire & Dudel, 2007). *Lemna minor* tuvo gran pérdida de su peso después del proceso de secado lo que sugiere una alta relación contaminantes/biomasa de *Lemna minor*, confirmándose así su potencial de biorremediación.

### **3.4 Efecto de los Sólidos en el crecimiento de *Chlorella sp***

#### **3.4.1 Clorofila a y Carotenos**

Tanto clorofila como pigmentos disminuyeron notablemente (figura 9.), resultados que evidencian los efectos negativos de los sólidos en el crecimiento de la microalga. A pesar de su capacidad de biorremediar sólidos suspendidos totales, utilizar solamente *Chlorella sp* en un sistema de tratamiento de aguas no representa una buena opción, su acción se potencializaría utilizando a *Lemna minor* simultáneamente y no por separado como se realizó en esta experimentación. Sino en tándem, en un solo ciclo, ya que *L. minor* haría biorremoción de sólidos en la superficie del agua, además de controlar el crecimiento de las microalgas debido a que sus frondas reducen la penetración de la luz y por ende alterarían la actividad fotosintética, simultáneamente, las microalgas podrían remover sólidos en la parte inferior del cuerpo de agua.

#### **3.4.2 Peso Seco**

Las fluctuaciones durante los días de muestreo en cada uno de los tratamientos fueron bastante notorias, con días de incremento y otros de disminución en la

cantidad de peso seco (figura 10.). Las microalgas no son tan tolerantes a la contaminación como lo es *Lemna minor*. En el único y último día de evaluación se observa que el tratamiento 1 y 2 estuvieron por encima del control, el tratamiento 1 presentó mayor peso seco probablemente debido a los demás microorganismos no esterilizados que estaban en el agua residual.

#### 4. CONCLUSIONES

*Lemna minor* representa una muy buena opción para la biorremediación de los sólidos de aguas residuales de centrales térmicas, en especial, en el secuestro de los sólidos suspendidos totales, sin tener efectos negativos en su crecimiento, efectos que si se presentaron en *Chlorella sp* a pesar de su capacidad de biorremoción de sólidos suspendidos fijos, lo que la hace inestable y poco tolerante a este tipo de contaminantes.

## RECOMENDACIONES

Para un próximo estudio es importante incrementar el número de unidades experimentales, y usar más de dos reactores por tratamiento, lo mejor sería utilizar desde tres o cuatro reactores.

Con *Chlorella sp* los resultados se vieron afectados debido a su uso libre, ya que el mismo peso de las microalgas interfirió con el peso de los sólidos totales y los sólidos suspendidos totales así que sería importante implementar dentro del sistema un biopolímero en el que se fijen las microalgas y su proliferación y crecimiento sean controlados.

Se puede establecer un sistema de inoculación simultánea de la planta y las microalgas y no con ciclos consecutivos, para potencializar su uso y eficiencia en la biorremediación, ya que un esquema en tándem permitiría una acción biorremediante en conjunto por parte de la macrófita y las microalgas

## BIBLIOGRAFÍA

Alemaný. L., Larrubia, M., Jimenez, M., Blasco, J. (1998). Revalorización de cenizas de combustión, *Revista de Ingeniería Química – España*. 344:169–174.

APHA. American Public Health Association (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Clesceri L.S., Greenberg A.E., Eaton A.D. (Eds.). American Water Works Association, Water Environment Federation. 20th ed. pp. 1325.

Arroyave, M.P. (2004). La lenteja de agua (*Lemna minor* L.): una planta acuática promisoría. *Revista EIA, Escuela de Ingeniería de Antioquia*. 1:33-38.

Atkinson, B., Bux, W., Kassan, H. (1998). Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents. *Water SA*. 24:129-135.

Azeez, N.M & Sabbar, A.A. (2012). Efficiency of duckweed (*Lemna minor* L.) in phytotreatment of wastewater pollutants from Basrah oil refinery. *Journal of Applied Phytotechnology in Environmental Sanitation*. 1(4):163-172.

Bilotta, G.S. & Brazier, R.E. (2008). Understanding the influence of suspended solids on water quality and aquatic biota. *Water research*. 42:2849-2861.

Cañizares, R.O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista latinoamericana de microbiología*. 42:131-143.

Cortón, E. & Viale, A. (2006). Solucionando grandes problemas ambientales con la ayuda de pequeños amigos: las técnicas de biorremediación. *Ecosistemas*. 15(3):148-157.

- Crawford, D.J., Landolt, E., Les, D.H., Kimball, R.T. (2001). Allozyme studies in Lemnaceae: variation and relationships in *Lemna* sections *alatae* and *biformes*. *Taxonomy*. 50:987-999.
- De-Bashan, L. & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource technology*. 101:1611-1627.
- Droppo I.G., Leppard G.G., Flannigan D.T., Liss, S.N. (1997). The freshwater floc: a functional relationship of water and organic and inorganic floc constituents affecting suspended sediment properties. *Water air soil pollut.* 99:43-53.
- Droppo, I.G. (2001). Rethinking what constitutes suspended sediment. *Hydrological processes*. 15:1551-1564.
- ECOCARBÓN. (1996). Plan de Desarrollo del Subsector carbón 1997-2005. Bogotá.
- EL-Kheir, W. A., Ismail, F., EL-Nour, F. A., Tawfik, T., Hammad, D. (2007). Assessment of the efficiency of duckweed (*Lemna gibba*) in wastewater treatment. *International Journal of Agriculture & Biology*. 9(5):681-687.
- EPA. Environmental Protection Agency. "Hazardous and solid waste management system; Identification and listing of special wastes; Disposal of coal combustion residuals from electric utilities." II [EPA-HQ-RCRA-2009-0640; FRL-9149-4] Proposed rule.
- Faisal, M. & Hasnain, S. (2004). Microbia conversion of Cr (VI) into Cr (III) in industrial effluent. *African Journal of biotechnology*. 3(11):610-617.
- Garza, M.T. & Coto, O. (2005). Aislamiento de microorganismos con alta capacidad de tolerar y remover Pb (II), Cr (VI), Cd (II), Cu (II), Zn (II) y Ni (II). Universidad autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L. México. pp. 143.

Gottlieb, B., Gilbert, S., Gollin, L. (2010). Coal ash. The toxic threat to our health and environment. A report from physicians for social responsibility and earth justice. pp. 38.

Greene, B. & Bedell, G.W. (1990). Algal gels or immobilized algae for metal recovery. In: Akatsuka, I. (Ed.), Introduction to Applied Phycology. SPB Academic Publishing, The Hague, Netherlands, pp. 137-149.

Guía ambiental plantas Carboeléctricas: file:///C:/blanca **di zeo**/Guías Resolución 1023 del 28 de julio de 2005/Guía ambiental para proyectos carboeléctricos/contenid/analisis.htm.

Horvat, T., Vidakovic-Cifrek, Z., Orescanin, V., Tkalec, M., Pevalek-Kozlina, B. (2007). Toxicity assessment of heavy metal mixtures by *Lemna minor* L. Science of the Total Environment 384:229-238.

Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q., Chang, C.C. (2007). Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). Plant physiology and biochemistry journal. 45:62-69.

IDEAM. (2002). Guía para el monitoreo de vertimientos, aguas superficiales y subterráneas. pp. 83.

INGEOMINAS. (2004). El Carbón Colombiano. Recursos, Reservas y Calidad. Bogotá.

Iram, S., Ahmad, I., Riaz, Y., Zahra, A. (2012). Treatment of wastewater by *Lemna minor*. Pakistan Journal of Botany. 44(2):553-557.

Jafari, N. & Akhavan, M. (2011). Effect of pH and heavy metal concentration on phytoaccumulation of zinc by three duckweeds species. Journal of Agricultural & Environmental Sciences. 10 (1):34-41.

- Kanon-Boulé, M., Vicente, J.A.F., Nabais, C., Prasad, M.N.V., Freitas, H. (2009). Ecophysiological tolerance of duckweeds exposed to copper. *Aquatic toxicology*. 91:1-9.
- Kaplan, D., Heimer, Y.M., Abeliovich, A., Goldsbrough, P.B. (1995). Cadmium toxicity and resistance in *Chlorella sp.* *Plant Science*. 109:129-137.
- Karpiscak, M.M., Foster, K.E., Hopf, S.B., Bancroft, J.M., Warshall, P.J. (1994). Using water hyacinth to treat municipal wastewater in the desert southwest. *Water Resources Bulletin*. 30:219-27.
- Landesman, L. (2000). Effects of herbivory and competition on growth of Lemnaceae in systems for wastewater treatment and livestock feed production. University of Louisiana at Lafayette, Louisiana. pp. 150.
- Levin, M.A. & Gealt, M.A. (1997). Visión general del biotratamiento y su futuro En: Levin M.A. & Gealt, M.A. Editors. *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos*. McGraw Hill / interamericana, Madrid, España. pp. 1-19.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Photosynthesis, respiration, and chlorophylls in presenescent, regreened, and senescent leaves of forest herb *Smyrniium perfoliatum* L. 20:173-178.
- Lim, S., Chu, W., Phang, S. (2010). Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. *Bioresource Technology*. 101:7314-7322.
- Lloyd, D.S. (1987). Turbidity as a water quality standard for salmonid habitat in Alaska. *North American journal of fisheries management*. 7(1):34-45.
- López, J., Garcia, O., Grima, J., Ballesteros, B., Pérez, M. (2001). Técnicas de biorrecuperación In situ de acuíferos contaminados por metales pesados. Instituto geológico y minero de España. Oficina de proyectos de valencia. pp. 233-243.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2003). *Brock Biology of microorganisms*. Pearson education incorporated. New Jersey.

- Mallick, N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review biometals. 15:377-390.
- Mamun, A.A., Amid, A., Karim, I.A., Rashid, S.S. (2012). Phytoremediation of partially treated wastewater by *Chlorella vulgaris*. International conference on chemical processes and environmental issues (ICCEEI' 2012).
- Manahan, S. (2000). Environmental chemistry. 7<sup>th</sup> edition. USA; Lewis publishers. pp. 55-97.
- Metcalf & Eddy, Incorporated. (1995). Ingeniería de aguas residuales: tratamiento, vertido y reutilización.
- Miller, G.T. (1995). Environmental science working with the earth, 5<sup>th</sup> edition. Wadsworth publishing company, Belmont, California.
- Mkandawire, M. & Dudel, E.G (2007). Are *Lemna* spp. Effective Phytoremediation Agents?. Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability I (I). Global Science Books. pp. 56-71.
- Mkandawire, M. (2005). Fate and effect of uranium and arsenic in surface waters of abandoned uranium mines: studies with *Lemna gibba* L. Shaker, Aachen. pp. 185.
- Mohan, B.S. & Hosetti, B.B. (1999). Aquatic plants for toxicity assessment. Environmental research. 81:259-274.
- Obek, E. & Hasar, H. (2002). Role of duckweed (*Lemna minor* L.) harvesting in biological phosphate removal from secondary treatment effluents. Fresenius Environmental Bulletin. 11:27-29.
- Olguin, E.J. (2003). Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. Biotechnology advances. 22:81-91.

OMS. (2003). Total dissolved solids in drinking-water. Documento de referencia para la elaboración de las guías de la OMS para la calidad del agua potable. Ginebra (Suiza). Organización Mundial de la Salud (WHO/SDE/WSH/03.04/16).

Oporto, C., Arce, O., Van den Broeck, E., Van der Bruggen, B., Vandecasteele, C. Water Research. 40:1458-1464.

Oswald, W.J. (1988). Micro-algae and waste-water treatment. In: Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (Eds). Micro-algal biotechnology. Cambridge university press. pp. 305-328.

Oswald, W.J. (2003). My sixty years in applied algology. Journal of applied phycology. 15(2-3):99-106.

Radic, S., Stipanicev, D., Cvjetko, P., Mikelic, I.L., Rajcic, M.M., Sirac, S., Devalek-Kozlina, B., Pavlica, M. (2009). Ecotoxicological assessment of industrial effluent using duckweed (*Lemna minor* L.) as a test organism. Ecotoxicology journal. 19(1):216-222.

Rahmani, G.N.H. & Sternberg, S.P.K. (1999). Bioremoval of lead from water using *Lemna minor*. Bioresource Technology. 70:225-230.

Rasband, W.S. (2011). ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Bethesda, Maryland, USA.

Ryan, P.A. (1991). Environmental effects of sediment on New Zealand streams: a review. New Zealand Journal of Marine & Freshwater Research. 25: 207-221.

Salgado-Bernal, I., Martinez-Sardiñas, A., Carballo-Valdés, M. E., Cruz-Arias M., Durán-Domínguez M. d. C. (2012). Efectos ambientales de contaminantes químicos en las aguas: una propuesta biotecnológica para su eliminación. Tecnología química. 32(1):90-98.

Shankar, A.H. & Prasad, A.S. (1998). The American journal of clinical nutrition, 68:447-463.

- Shelef. (1979). Bioconversion of organic residues for rural communities (UNU), (UNU). pp. 178.
- Smets, B.F. & Rittmann, B.E. (1990). Sorption equilibria for trichloroethene on algae. *Water research*. 24(3):55-60
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. (1979). *Biometría. Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica*. H. Blume Ediciones. España. p. 832.
- Suresh, B. & Ravishankar, G.A. (2004). Phytoremediation – a novel and promising approach for environmental clean-up. *Critical reviews in biotechnology*. 24:97-124.
- Thermal Power Plants. (2005). Fuji electric group. Tokyo, Japan. *Fuji electric review*. 51(3):1-38.
- Travieso, L., Benítez, F., Sánchez, R., Borja, R., León, M., Raposo, F., Rincón. (2008). Performance of a Laboratory-scale Microalgae Pond for Secondary Treatment of Distillery Wastewaters. *Chemical & Biochemical Engineering Quarterly*. 22 (4):467-473.
- UPME. (2006). Mercado Nacional e Internacional del Carbón Colombiano. Ministerio de Minas y Energía. Unidad de Planeación Minero Energética – UPME. Bogotá D.C. p. 1-114.
- Valderrama, L.T., Del Campo, C.M., Rodríguez, C.M., Bashan, L.E., Bashan, Y. (2002). Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water research*. 36:4185-4192.
- Van Cauwenberghe, L. & Roote, D.S. (1998). Technology overview reports in situ bioremediation (TO-98-01). Available at: <http://www.gwrtac.org>
- Van Nieuwenhuysse, E.E. & LaPerriere, J.D. (1986). Effects of placer gold mining on primary production in subarctic streams of Alaska. *Water research*, 22:91-99.

Vasseur, L. & Aarssen, L.W. (1992). Phenotypic plasticity in *Lemna minor* (Lemnaceae). *Plant systematics and evolution*. 180:205-219

Volesky, B. (1999). Biosorption for the next century. Chemical engineering department. Mc Gill University, Canadá.

Waters, T.F. (1985). Sediment in streams: sources, biological effects and controls. American fisheries society monograph 7, Bethesda, MA.

Wiley, & Sons (2005). Incorporated, Handbook of Food Analytical Chemistry. United States of America. p. 171.

Zar, J.H. (1984). Biostatistical Analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. pp. 718.

Zimmo, O.R., Van der Steen, N.P., Gijzen, H.J. (2005). Effect of organic surface load on process performance of pilot-scale algae and duckweed-based waste stabilization ponds. *Journal of Environmental Engineering*. 131:587-594.

## ANEXOS

### Anexo A. Medio de cultivo Bold Basal

<b>Macronutrientes</b>		
<i>Soluciones Stock</i>	<i>Para 400 mL</i>	
(1) NaNO <sub>3</sub>	10,0 g	
(2) MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3,0 g	
(3) NaCl	1,0 g	
(4) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,0 g	
(5) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,0 g	
(6) CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,0 g	
<b>Micronutrientes</b>		
<i>Soluciones Stock</i>	<i>Para 1 L</i>	
Soluciones de elementos de traza (autoclave para disolverse)	(7) ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,82 g
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,44 g
	MoO <sub>3</sub>	0,71 g
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,57 g
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,49 g
	(8) H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,42 g
	(9) EDTA	50,0 g
	KOH	31,0 g
	(10) FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,98 g
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (concentrado)	1,0 mL
<b>Medio Bold Basal</b>		
<i>Soluciones Stock</i>	<i>Para 1 L</i>	
Macronutrientes	10,0 mL de cada uno	
Micronutrientes	1,0 mL de cada uno	