

**BIOREMOCIÓN DE MANGANESO PRESENTE EN AGUAS RESIDUALES DE
UNA PLANTA TERMOELÉCTRICA COLOMBIANA MEDIANTE EL CULTIVO DE
Lemna minor y *Chlorella sp***

**CAMILO ANDRÉS LÓPEZ PULIDO
HÉCTOR FABIÁN TAPIAS BAUTISTA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2013

**BIOREMOCIÓN DE MANGANESO PRESENTE EN AGUAS RESIDUALES DE
UNA PLANTA TERMOELÉCTRICA COLOMBIANA MEDIANTE EL CULTIVO DE
Lemna minor y *Chlorella sp***

**CAMILO ANDRÉS LÓPEZ PULIDO
HÉCTOR FABIÁN TAPIAS BAUTISTA**

**Trabajo de grado en la modalidad de investigación, presentado para optar al
título de Ingeniero Químico**

**Director
VIATCHESLAV KAFAROV
Ingeniero Químico Dr. Sc**

**Codirectores
ANDRÉS FERNANDO BARAJAS
Biólogo
JAVIER MAURICIO VILLAMZAR CUJAR
Biólogo**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2013

DEDICATORIAS

A mi **madre** Blanca Lilia Pulido Plazas, por su amor, comprensión y total apoyo en cada momento de mi vida, esta meta lograda se la debo a ella, gracias por ser esa hermosa persona que me ha enseñado a vivir la vida, no hay palabras en este mundo para agradecerte, te amo.

A mi **padre** Ramón Octavio López Colmenares por instruirme cada día una gran formación como hombre, por enseñarme a no tener miedo a enfrentarme los diferentes retos, por su cariño incondicional que siempre me ha brindado gracias.

A mis **hermanas** Karen Liliana y Andrea Del Pilar, por ser la fuerza que me impulsa a lograr cumplir mis objetivos de vida, porque en ellas encuentro la motivación para ser una mejor persona, nunca las defraudare.

A toda mi **familia** por sus palabras de aliento y sus buenos deseos.

A mis **hermanos** Diego Arias, Rodrigo Pulido, Javier Sánchez, Manuel González, Fabián Tapias, Noel Galvis, Nelson Mena, Jonathan torres, Manuel Serna, los quiero.

A mi **novia** Kelly Tatiana chacón, por creer en mí, por darme la energía que día a día necesito, llegaste en el momento indicado, te quiero mi hermosa.

A mi **amigo** Dios, porque a pesar de todo nunca me abandono, la cuenta aumenta te debo muchas.

A todas las personas que contribuyeron a la realización de este trabajo.
Con mucho cariño para todos ustedes.

Camilo Andrés López Pulido

*A mi madre **Esperanza**.*

Porque es la persona que siempre ha estado conmigo, en las buenas y en las malas, amándome y deseándome siempre lo mejor.

*A mi padre **Héctor Manuel**.*

Porque es mi ejemplo a seguir, la persona que siempre me ha dado su apoyo en cada paso de mi vida.

*A mi hijo **Fabián Santiago**.*

Por ser el motor de mi vida, y la razón de mi existir.

*A mi prometida, **Laura Juliana**.*

Por aparecer en mi vida en el momento indicado, y darme su amor en todo momento.

*A mis Hermanos, **Leidy, Oscar y Jhon**.*

Por ser parte fundamental de mi vida.

*A mi compañero de trabajo, **Camilo Andrés**.*

Porque más que un amigo, es un hermano.

*A mis **Amigos y Familiares**.*

Por sus buenos deseos y apoyo en todo momento.

A todos ustedes les dedico este Triunfo, LOS AMO.

Hector Fabián Tapias Bautista

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a:

DR. SC. VIATCHESLAV KAFAROV, por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y por su respaldo como director del proyecto.

BIÓLOGO ANDRÉS BARAJAS por su apoyo y orientación en el desarrollo del presente trabajo.

BIÓLOGO JAVIER VILLAMIZAR, por su apoyo, orientación y colaboración en el desarrollo de todo el proyecto.

ADMINISTRAMOS Y TRANSPORTAMOS A.T S.A.S, por la financiación y el suministro de los implementos necesarios para la elaboración y desarrollo de este proyecto.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN MINERALES, BIOHIDROMETALURGÍA Y AMBIENTE (GIMBA), SEDE GUIATIGUARA, por permitirnos acceder a los equipos necesarios para el desarrollo de nuestro estudio.

EDUARDO CARREÑO Y WILSON CARREÑO, guías en el laboratorio de procesos de Ingeniería Química, por su enseñanza, ayuda y orientación durante la ejecución de las pruebas experimentales.

INGENIERO GUILLERMO ACERO, encargado de los laboratorios de investigación de ingeniería química, por su atención y colaboración.

A los profesores de ingeniería química por sus consejos y colaboración y a todas aquellas personas que hicieron parte de este proceso.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	16
1. OBJETIVOS.....	19
2. MARCO TEÓRICO	20
3. METODOLOGÍA	22
3.1 Caracterización del Agua	22
3.2 Métodos de Cultivo	22
3.3 Montaje Experimental	23
3.4 Cuantificación del Mn ²⁺ Bioremovido	24
3.5 Cuantificación de pigmentos en <i>Lemna minor</i>	26
3.6 Cuantificación de pigmentos en <i>Chlorella sp</i>	28
3.7 Cinética de Eliminación de Mn ²⁺	29
3.8 Cinética de Adsorción de Mn ²⁺	30
3.9 Cinética de Acumulación intracelular de Mn ²⁺	30
3.10 Análisis estadístico	31
4. RESULTADOS	32
5. DISCUSIÓN	40
6. CONCLUSIONES	45
7. RECOMENDACIONES	46
CITAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	54
ANEXOS.....	56

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Caracterización preliminar del agua residual.....	32
Tabla 2. Constantes de velocidad de la eliminación de Mn^{2+} (k) en agua residuales con <i>Lemna minor</i> usando dos diferentes modelos cinéticos.....	33
Tabla 3. Constantes de velocidad de la adsorción de Mn^{2+} (k) en agua residuales con <i>Lemna minor</i> usando dos diferentes modelos cinéticos.	35
Tabla 4. Constantes de velocidad de la eliminación de Mn^{2+} (k) en agua residuales con <i>Chlorella sp</i> , usando dos diferentes modelos cinéticos.	37
Tabla 5. Constantes de velocidad de la absorción de Mn^{2+} (k) en agua residuales con <i>Chlorella sp</i>	38
Tabla 6. Porcentajes de Adsorción, Absorción y Bioremoción en el T1 y T2 con los cultivos <i>Lemna minor</i> y <i>Chlorella sp</i> durante el periodo de exposición.	40
Tabla 7. Porcentaje de bioremoción total.	44

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Montaje de la planta de tratamiento con <i>Lemna minor</i> y <i>Chlorella sp.</i>	25
Figura 2. Procedimiento para la cuantificación del manganeso bio removido.	27
Figura 3. Porcentaje de Remoción de Mn^{2+} con <i>Lemna minor</i> durante el tiempo de exposición.	33
Figura 4. Porcentaje de Adsorción de Mn^{2+} , a través de <i>Lemna minor</i>	34
Figura 5. Porcentaje de Absorción de Mn^{2+} , a través de <i>Lemna minor</i>	34
Figura 6. Efecto del Mn^{+2} en la clorofila total (mg/g) de <i>Lemna minor</i>	36
Figura 7. Porcentaje de Remoción de Mn^{2+} con <i>Chlorella sp.</i> , durante el tiempo de prueba.	36
Figura 8. Porcentaje de Adsorción de Mn^{2+} con <i>Chlorella sp.</i>	37
Figura 9. Porcentaje de Absorción de Mn^{2+} con <i>Chlorella sp.</i>	38
Figura 10. Efecto del Mn^{+2} en la clorofila total ($\mu g/ml$) de <i>Chlorella sp</i>	39
Figura 11. Bioremoción total de Mn^{2+} , para un sistema complementario, <i>Lemna minor</i> y <i>Chlorella sp.</i>	43.

TABLA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. NORMATIVIDADES AMBIENTALES POR EL DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO DE MEDIO AMBIENTE para el vertimiento de aguas residuales	56
ANEXO B. TABLA ANOVA	57

RESUMEN

TITULO: BIOREMOCIÓN DE MANGANESO PRESENTE EN AGUAS RESIDUALES DE UNA PLANTA TERMOELÉCTRICA COLOMBIANA MEDIANTE EL CULTIVO DE *Lemna minor* y *Chlorella sp.*

AUTORES: CAMILO ANDRES LOPEZ PULIDO, HECTOR FABIAN TAPIAS BAUTISTA

PALABRAS CLAVE: Bioremediación, aguas residuales, metales pesados, microalgas, macrófitas.

El Manganeseo, es un metal pesado que hace parte de los efluentes de las centrales térmicas y otras industrias asociadas al carbón. El objetivo de nuestra investigación fue evaluar la capacidad de bioremediación de manganeseo, mediante el cultivo de *Lemna minor* y *Chlorella sp.* Se realizaron dos experimentos consecutivos durante 32 días. En la primera etapa del experimento se utilizó como cultivo *L. minor* y en la segunda *Chlorella sp.*, durante un tiempo de exposición para cada especie de 16 días. Se establecieron dos tratamientos. El tratamiento 1 (T1) correspondió a agua residual sin esterilizar mientras el tratamiento 2 (T2), fue establecido a partir de agua residual esterilizada. Se evaluó la cinética de eliminación, el estudio de la distribución del Mn^{2+} (adsorbido, absorbido) y el efecto de este en el crecimiento de los cultivos. El resultado de remoción de Mn^{2+} usando *L. minor*, se ajustó a un modelo cinético de eliminación de primer orden removiendo 0.0658 mg Mn^{2+} /día en el T1 y 0.024 mg Mn^{2+} /día en el T2, alcanzando porcentajes de remoción en (66,47%) y (39,16%) respectivamente; se identificó que la mayor cantidad de Mn^{2+} eliminado de las unidades experimentales contenidas de agua residual fue por el sistema de adsorción. *Chlorella sp.* eliminó 0,0353 Mn^{2+} /día en el T1 y 0,0796 Mn^{2+} /día en el T2, alcanzando porcentajes de remoción en (45.49%) y (71.98%) respectivamente, se determinó que la acumulación intracelular fue el principal mecanismo de remoción de Mn^{2+} . Finalmente, se reportó el efecto de Mn^{2+} en el crecimiento de ambos cultivos.

*Trabajo de grado

**Facultad de ingenierías Físicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Directores: Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov. Codirectores: Biólogo: Andrés Fernando Barajas, Biólogo: Javier Mauricio Villamizar Cújar.

ABSTRACT

TITLE: MANGANESE BIOREMOVAL PRESENT IN WASTEWATER BY COLOMBIAN THERMOELECTRIC PLANT BY THE CULTIVATION OF *Lemna minor* and *Chlorella sp.*

AUTHORS: CAMILO ANDRES LOPEZ PULIDO, HECTOR FABIAN TAPIAS BAUTISTA.

KEY WORDS: Bioremoval, wastewater, heavy metals, microalgae, macrophytes.

Manganese is a heavy metal that is part of the effluents from thermal power stations and other industries associated with coal. The objective of our research was to evaluate the ability of bioremoval manganese, by cultivating *Lemna minor* and *Chlorella sp.* Two experiments were conducted for 32 consecutive days. In the first stage of the experiment was used as culture *L. minor* and second *Chlorella sp.*, for an exposure time for each species of 16 days. Two treatments were established. Treatment 1 (T1) corresponded to non-sterile wastewater while treatment 2 (T2) was established from sterilized wastewater. The kinetics of elimination, the study of the distribution of the Mn^{2+} (adsorbed, absorbed) and the effect of this on the growth of crops, were evaluated. The result of removal of Mn^{2+} using *L. minor*, was adjusted to a kinetic model of first-order elimination removing 0.0658 mg Mn^{2+} / day in T1 and 0.024 mg Mn^{2+} / day in T2, reaching removal percentages in (66.47%) and (39.16%) respectively, were identified as the highest amount of Mn^{2+} experimental units removed from waste water was contained by the adsorption system. *Chlorella sp* remove 0,0353 mg Mn^{2+} / day in T1 and 0.0796 mg Mn^{2+} / day in t2, reaching removal percentages in (45.49%) and (71.98%) respectively, it was determined that the intracellular accumulation was the main mechanism removing Mn^{2+} . Finally, reported Mn^{2+} effect on the growth of both cultures.

*Graduation Project

** Physical-Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering Department. Director: Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov. Co-directorS: Bio. Andrés Fernando Barajas, Bio. Javier Mauricio Villamizar Cújar

INTRODUCCIÓN

Debido al incremento en el tamaño poblacional a nivel global, se ha incrementado la industria y con ello la emisión de contaminantes al medio ambiente, entre ellos, aguas residuales industriales [1]. En condiciones normales los ríos tienen la capacidad de autodepurarse, es así, que las aguas residuales industriales arrastran diversos contaminantes hacia ríos y demás fuentes hídricas, donde las bacterias utilizan el oxígeno disuelto en las aguas y degradan los compuestos orgánicos, que a su vez, son consumidos por los peces y las plantas acuáticas, devolviendo el oxígeno y el carbono a la biosfera [2]. Sin embargo, existen diversos contaminantes ambientales, que no pueden ser degradados; éste es el caso de los metales pesados, que son descargados al medio ambiente desde diversas industrias, tales como la textil, pigmentos, plásticos, minería, galvanoplastia, generación energética a partir de carbón, procesos metalúrgicos, entre otras [1]. El término metal pesado colectivamente se aplica a un grupo de los metales con una densidad mayor que 5 g/cm^3 ; y número atómico superior a 20 [3].

Debido a su efecto tóxico y tendencia de acumulación, la contaminación por metales pesados en altas concentraciones representa un importante problema en la salud humana y en la mayoría de formas de vida [4]. Las centrales térmicas que basan su proceso en la utilización de carbón, pueden ser una fuente de contaminación, debido a que en el proceso se emiten cenizas producto de la incineración del carbón, cenizas que contienen por lo general metales pesados como: arsénico (As), antimonio (Sb), bario (Ba), berilio (Be), boro (B), cadmio (Cd), cromo (Cr), plomo (Pb), mercurio (Hg), y selenio (Se), así como el aluminio (Al), cloro (Cl), cobalto (Co), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni), talio (Tl), vanadio (V) y zinc (Zn) (EPA, 2009). Es así que la industria minera [5], y la industria asociada al carbón (*i.e* centrales térmicas), liberan al ambiente cenizas y efluentes ricos en metales pesados tóxicos [6,7].

El manganeso (Mn^{2+}) es un compuesto muy común que puede encontrarse en todas partes de la tierra; además, es uno de los tres elementos tóxicos traza esenciales, lo que significa que no sólo es un micronutriente esencial para la vida de plantas y animales, entre ellos el ser humano, sino que también es tóxico cuando se encuentra a concentraciones demasiado altas en un cuerpo humano [8]. La absorción de manganeso ocurre mediante el consumo de agua y alimentos en la mayoría de los casos, éste es transportado a través de la sangre hacia el hígado, los riñones, el páncreas y las glándulas endocrinas. Los efectos del manganeso se producen principalmente en el tracto respiratorio y en el cerebro. Los síntomas de la intoxicación por manganeso son alucinaciones, daños en el sistema nervioso y en alguno de los casos también puede causar Parkinson, embolia pulmonar y bronquitis.

El Mn^{2+} actúa como un cofactor enzimático, y está presente en la estructura de proteínas que participan de la fotosíntesis [9]. Bajo déficit de Mn^{2+} , se afecta el funcionamiento de la fotosíntesis al afectar la producción de energía necesaria para el proceso fotosintético [10]. En exceso de Mn^{2+} , se ha evaluado la inhibición de la fotosíntesis como producto de la reducción de la síntesis y contenido de pigmentos fotosintéticos [11]. Por lo tanto, la alteración de los pigmentos fotosintéticos, se puede utilizar como un indicador del daño que experimenta el tejido vegetal bajo una concentración tóxica de un metal pesado (*i.e* Mn^{2+}), permitiendo evaluar dicha toxicidad [12].

Existen varios métodos físico-químicos para la eliminación de metales pesados en aguas residuales, dentro de los cuales se encuentran: precipitación, intercambio iónico, osmosis inversa, extracción con disolventes y separación de membrana, sin embargo la mayoría de estos tienen varias desventajas, proporcionan una eliminación del metal incompleta, son poco rentables o resultan muy costosos en términos energéticos o en consumo de productos químicos [13]. Por esta razón, la búsqueda de tecnologías alternativas se ha centrado en el uso de materiales

biológicos, tales como bacterias, hongos, macrófitas y microalgas. Estos materiales biológicos son fácilmente accesibles y su relación costo beneficio es rentable, además, algunos de ellos pueden ser subproductos de procesos industriales [14].

Lemna minor se encuentra dentro del grupo de las plantas flotante. Ésta planta es de distribución universal, de rápido crecimiento y de amplia distribución tropical y subtropical la cual se encuentra principalmente en charcos de agua dulce, ciénagas, lagos y ríos calmados [15]. *Lemna minor* puede desarrollarse en un rango amplio de temperaturas, que varía entre 5° y 30°C, con un crecimiento óptimo entre los 15° y 18°C. Se adapta bien a cualquier condición de iluminación. Crece rápidamente en partes calmadas y ricas en nutrientes, con altos niveles de nitrógeno y fosfatos. Puede además tolerar un rango de pH amplio, siendo el óptimo entre 4,5 y 7,5 [16]. *Lemna minor* presenta un gran potencial de eliminación de metales pesados en el tratamiento de aguas residuales [17].

Las algas del genero *Chlorella*, han sido utilizadas ampliamente en procesos de bioremediación con el fin de remover metales pesados y materia orgánica. Los componentes de su pared celular contribuyen a su capacidad para retener variados contaminantes ambientales presentes en cuerpos de agua [18]. Se ha demostrado que existe un alto potencial de bioremediación de metales pesados contenidos en el agua, utilizando como fuente de biomasa microalgas y macroalgas [18]. Este tipo de biomasa es de fácil recolección y su tasa de crecimiento es muy elevada, asimismo, absorbe metales de manera rápida [18]. El tratamiento de aguas residuales mediante el uso de microalgas es un proceso respetuoso con el medio ambiente que no genera contaminantes secundarios [19].

1. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la bioremoción de manganeso presente en aguas residuales de una planta termoeléctrica colombiana mediante el cultivo de *Lemna minor* y *Chlorella sp.*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar la cinética de eliminación de Mn^{2+} en *Lemna minor* y *Chlorella sp.*
- Determinar la distribución de Mn^{2+} en los diferentes cultivos, identificando los mecanismos de remoción: adsorción y acumulación intracelular.
- Determinar el efecto de la concentración de Mn^{2+} en el crecimiento de los cultivos.

2. MARCO TEÓRICO

Las prácticas de bioremediación consisten principalmente en el uso de diferentes organismos (plantas, levaduras, hongos, bacterias, etc.) del medio para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en sustancias de carácter menos tóxico o convirtiéndolas en inocuas para el medio ambiente y la salud humana. Una de las medidas de bioremediación más empleada es la utilización de microorganismos para la descontaminación de suelos. Estos sistemas de descontaminación se basan en la absorción de las sustancias orgánicas por parte de dichos microorganismos, los cuales las utilizan como la fuente de carbono necesaria para su crecimiento y de energía para sus funciones metabólicas [20].

Recientemente, está bien establecido el potencial de adaptación de algunos microorganismos en zonas contaminadas con metales pesados, y el uso de su biomasa viva y/o muerta para tratar de eliminarlos de los diferentes nichos acuáticos contaminados [21]. La eficacia de los procesos de bioremediación, se encuentra condicionada por diversos factores dependientes de los distintos actores implicados en el proceso: microorganismos, metales, y propiedades físico-químicas y nutricionales del entorno de actuación, además, condicionantes genéticos, fenómenos de co-metabolismo, naturaleza del metal, biodisponibilidad del contaminante, disponibilidad de nutrientes, pH, temperatura, contenido en agua o características geológicas del ambiente contaminado, variables que determinan el éxito del proceso detoxificante [22].

El término “biosorción” ó “adsorción”, se utiliza para referirse a la captación de metales que lleva a cabo una biomasa completa (viva o muerta), a través de mecanismos fisicoquímicos como la adsorción o el intercambio iónico. Cuando se utiliza biomasa viva, los mecanismos metabólicos de captación también pueden contribuir en el proceso [23].

En la última década, el potencial para la biosorción de metales por biomasa ha quedado bien establecido [24]. Por razones económicas, resultan de particular interés los diversos tipos de biomasa, como los desechos generados por fermentaciones industriales de gran escala o de ciertas algas que enlazan metales y se encuentran en grandes cantidades en el mar. Algunos de estos tipos de biomasa que absorben metales en cantidades elevadas, sirven como base para los procesos de biosorción de metales, previendo su uso particularmente como medios muy competitivos para la destoxificación de efluentes industriales que contienen metales [24], y para la recuperación de metales preciosos [25].

La acumulación intracelular o bioacumulación es un proceso de acumulación de ciertos productos dentro de los organismos. Algunos metales pesados e hidrocarburos clorados son acumulados por los organismos acuáticos. Es por eso que pueden encontrarse concentraciones muy altas de estos elementos químicos en tejidos biológicos, aun cuando se hallen extremadamente diluidos en el medio acuático circundante [26].

Diferentes estudios demuestran que las plantas acumuladoras poseen varios mecanismos (mecanismos adaptativos fisiológicos y bioquímicos) de tolerancia a las elevadas concentraciones de metales pesados, por tal razón, algunas especies poseen genotipos capaces de desarrollarse en aguas altamente contaminadas con metales pesados. No solo toleran las elevadas concentraciones de metales, sino que los acumulan [26]. El tratamiento de aguas residuales mediante el uso de microalgas es un proceso respetuoso con el medio ambiente que no genera contaminantes secundarios [19].

3. METODOLOGÍA

3.1 Caracterización del agua.

El agua residual fue suministrada por 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. El agua fue enviada en contenedores de almacenamiento y recibida en la ciudad de Bucaramanga, donde se llevó en primera instancia a un sistema de caracterización realizado en el laboratorio químico de consultas industriales (LQCI), en la escuela de química de la Universidad Industrial de Santander, mediante el método de Absorción atómica – SM 3111 B, donde se midió la concentración inicial de los metales presentes en el agua (Tabla 1).

3.2 Métodos de Cultivo

Chlorella sp fue aislada a partir de muestras de agua residual de la empresa termoeléctrica. Inicialmente la cepa se cultivó en medio Bold Basal, cuya composición en mg/L es: NaNO_3 (2,94), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,04 \times 10^{-1}$) NaCl ($4,28 \times 10^{-1}$), K_2HPO_4 ($4,31 \times 10^{-1}$), KH_2PO_4 (1,29), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,70 \times 10^{-1}$) y micronutrientes (mg/L) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,07 \times 10^{-2}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($7,28 \times 10^{-3}$), MoO_3 ($4,93 \times 10^{-3}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($6,29 \times 10^{-3}$), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($1,68 \times 10^{-3}$), H_3BO_3 ($1,85 \times 10^{-1}$), EDTA ($1,71 \times 10^{-1}$), KOH ($5,53 \times 10^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,79 \times 10^{-2}$).

El alga se mantuvo en crecimiento utilizando reactores cilíndricos tipo airlift, con un diámetro interno de 14 cm y 35 cm altura, con un volumen de cultivo de 2 L. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo para la inyección de aire con un flujo de 600 mL/min y condiciones de temperatura de $17^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, pH entre 7 y 8, aireación permanente y ciclo luz-oscuridad 12:12 h, sin ningún suministro complementario de CO_2 .

Lemna minor (*L. minor*), fue obtenida a partir de estanques naturales y no contaminados, cercanos a la ciudad de Santafé de Bogotá, Colombia; ésta se mantuvo en crecimiento utilizando el mismo medio de cultivo que la cepa de *Chlorella sp* (Bold Basal) en reactores rectangulares, fabricados en acrílico (60 cm largo x 15 cm ancho x 40 cm alto), con una capacidad de 36 L. sin aireación.

3.3 Montaje experimental

Se utilizaron reactores rectangulares, fabricados en acrílico (60 cm largo x 15 cm ancho x 40 cm alto), con una capacidad de 36 L. Los reactores fueron aforados a un volumen de trabajo de 20,7 L para la primera etapa con *L. minor*. En el experimento posterior con *Chlorella sp*, los reactores presentaron un volumen de trabajo de 16,2 L. (producto de la reducción volumétrica generada por los muestreos realizados en el experimento con *Lemna minor*).

Se estableció un fotoperiodo 12:12 (horas luz – oscuridad), utilizando 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, instalados por pares en paralelo a los reactores y controlado mediante temporizadores digitales programables ELECTRIC LINE. Se monitoreó la temperatura (°C) y el pH del agua, mediante un analizador multiparámetro PCE – PHD 1. De igual manera, se monitoreó la temperatura máxima y mínima del laboratorio, cada 24 horas, mediante el uso de un termohigómetro digital (Cornwall, SH 101).

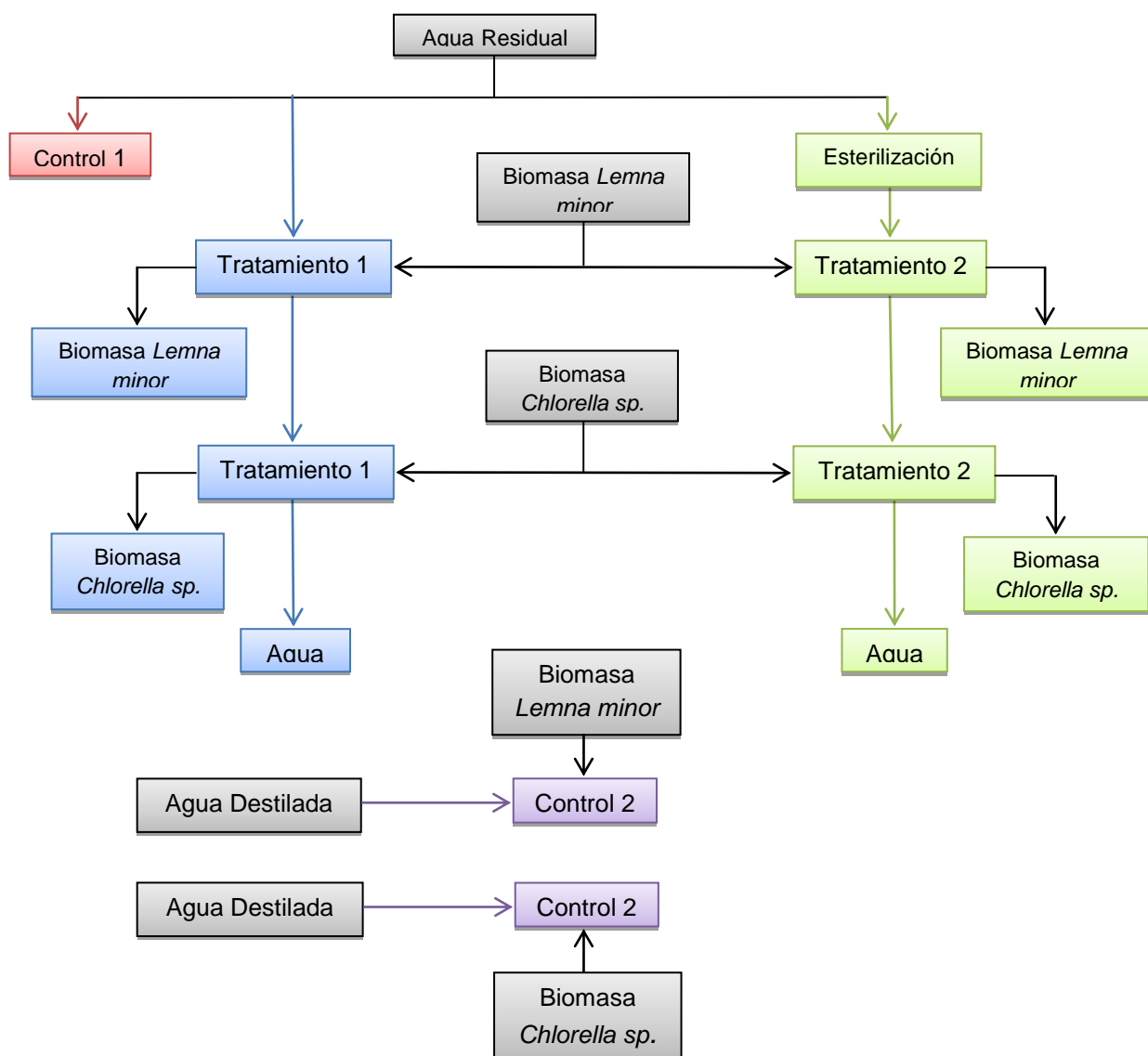
Con el fin de evaluar la bioremoción de Mn^{2+} mediante el cultivo de *L. minor* y *Chlorella sp*, se realizó un montaje de un sistema de unidades experimentales el cual se dividió en dos etapas de proceso; la primera etapa abarco los primeros 16 días del experimento y se utilizó como densidad de inóculo 12,5 g de biomasa de *L. minor*; en la segunda etapa del proceso la biomasa fue retirada y en su lugar se inoculó $1,5 \times 10^{-6}$ Cel. *Chlorella sp* /mL. Ésta segunda etapa fue llevada a cabo del día 16 al día 32.

Se realizaron dos experimentos consecutivos. Un experimento inicial evaluando la capacidad de bioremovición del Mn^{2+} por parte de *L. minor* (durante 16 días). Posteriormente, se realizó un segundo experimento con *Chlorella sp* (durante 16 días). Se establecieron dos tratamientos y un par de controles. Cada tratamiento u unidad experimental se estableció con reactores por duplicado. El tratamiento 1 (T1) correspondió a agua residual sin esterilizar e inóculo del organismo a evaluar (*L. minor* u *Chlorella sp*). El tratamiento 2 (T2), fue establecido a partir de agua residual esterilizada e inóculo del organismos a evaluar (en el primer experimento *L. minor*, y en el segundo experimento *Chlorella sp*). El control 1, presentó agua residual y el organismo a evaluar; y el control 2, agua de la llave y el organismo a evaluar.

3.4 Cuantificación del Mn^{2+} bioremovido a través de los mecanismos de adsorción y absorción en *L. minor* y *Chlorella sp*.

Con el objetivo de poder cuantificar la concentración de Mn^{2+} (C_{Mn}), acumulada intracelularmente (manganeso absorbido) y el metal adherido a la superficie de la biomasa (manganeso adsorbido) de *L. minor*, se realizó el estudio en base a *Standard Methods*, y a Olgún *et al.* [29] respectivamente, cuyos procedimientos se presentan de la siguiente manera:

Figura 1. Montaje de la planta de tratamiento con *Lemna minor* y *Chlorella sp.*



Para la primera etapa del proceso (*L. minor*) se tomaron muestras de 1 g. de biomasa *L. minor* y alícuotas de 50 ml de agua de manera duplicada y por cada unidad experimental para el T1, T2 y el control 1. Las alícuotas tomadas fueron filtradas y llevadas a una etapa de cuantificación utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica (E.A.A) de aspiración directa buck scientific modo 210 vgp, donde se tomaron los datos de las diferentes concentraciones de manganeso que

ayudaran a ver el análisis de bioremovición (**metal bio removido**), posteriormente cada gramo de biomasa tomado fue llevado a matraces Erlenmeyer de 500 mL, donde fue lavado con 100 mL de EDTA (Ácido etilendiaminotetracético) a 0.02M y llevados a un sistema de agitación donde se usaron agitadores magnéticos con diámetro de 1 pulgada durante 45 minutos.

Posteriormente la biomasa se lavó con 200 mL de agua desionizada y se volvió a llevar al sistema de agitación durante 15 minutos, éste procedimiento se realizó para eliminar remanentes de la solución de EDTA. Dichos lavados, se recolectaron, entre solución de EDTA y agua desionizada y se tomaron muestras de 10 mL en tubos de ensayo falcón, los cuales fueron llevados a análisis en el espectrofotómetro de absorción atómica para determinar el manganeso adherido a la superficie de la planta (**metal adsorbido**).

La biomasa retirada se dejó secar durante 15 minutos sobre papel filtro doblado por la mitad, para absorber el exceso de agua. Posteriormente se introdujeron en cajas de Petri para luego ser llevadas al horno a 105°C durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, se llevaron las muestras de biomasa a una báscula donde fueron pesadas y se procedió a registrar el peso seco de cada una de las muestras. La biomasa seca fue retirada, y se introdujo en vasos de precipitado de 100 mL de capacidad, siendo atacada con 5 mL de HNO₃ (ácido nítrico grado reactivo), dejando actuar la reacción durante 24 horas. Culminado el tiempo las muestras fueron filtradas al vacío, y llevadas a un sistema de aforo de 10 ml en tubos de ensayo falcón para un posterior análisis en el espectrofotómetro de absorción atómica (E.A.A) donde se cuantifico el manganeso acumulado intracelularmente por la planta (**metal absorbido**).

3.5 Cuantificación de pigmentos en *L. minor*.

Se determinó la clorofila de acuerdo a *Lichtenthaler H.K.* (1987), utilizando etanol como agente extractante. Las muestras fueron centrifugadas y leídas en un

promedio de 0.0019 g (DW). 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. Los cálculos para conocer la clorofila total presente en *L. minor* fueron realizados mediante la siguiente ecuación [30]:

$$C_{Total} = \frac{(5.24A_{664} + 22.24A_{648}) * 8,1}{DW} \quad [mg \cdot g^{-1} dw]$$

3.6 Cuantificación de pigmentos en *Chlorella* sp.

Se determinó la clorofila utilizando etanol como agente extractante [31]. 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 [31].

Los cálculos para conocer la clorofila total presente en *Chlorella sp* fueron realizados mediante la siguiente ecuación [31]:

$$C_{Total} = (5,24A_{664} - 22,24A_{648}) \quad [\mu g/ml]$$

Dónde:

C_{Total} = Clorofila Total

3.7 Cinética de eliminación de Mn^{2+} .

Para describir la variación del contenido de Mn^{2+} en función del tiempo, se utilizaron los siguientes modelos cinéticos [28]:

- Modelo Cinético de primer orden:

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

La cual se resuelve como:

$$\ln C = -K_1 t + \ln C_0$$

Dónde:

C_0 y C , son la concentración de Mn al tiempo cero y tiempo t , respectivamente (mg/L).

K_1 , es la constante de velocidad (días⁻¹) y K_2 , es la constante de velocidad (L/mg.h).

t , es el tiempo (días).

- Modelo Cinético de segundo orden:

$$\frac{dC}{dt} = -K_2 C^2$$

La cual se resuelve como:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + K_2 t$$

3.8 Cinética de Adsorción de Mn^{2+} .

Para evaluar la cinética de adsorción de Mn^{2+} , se utilizaron dos modelos de velocidad, la cinética de pseudo-primer orden [32], y la cinética de pseudo-segundo orden [33].

- Modelo Cinético de pseudo-primer orden:

$$\frac{dq}{dt} = K_1(q_e - q_t)$$

La cual se resuelve como:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - K_1 t$$

Dónde:

q 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 adsorción de primer orden (días^{-1}) y K_2 , es la constante de velocidad de adsorción de segundo orden (mg/g.h).

t, es el tiempo (días).

- Modelo Cinético de pseudo-segundo orden:

$$\frac{dq}{dt} = K_2(q_e - q_t)^2$$

La cual se resuelve como:

$$\frac{t}{q} = \frac{1}{K_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e}$$

3.9 Cinética de Acumulación intracelular de Mn^{2+}

El modelo de Michaelis-Menten, fue empleado para describir la acumulación intracelular presente en los diferentes tipos de biomasa [34].

- Modelo de Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} [Mn]}{K_m + [Mn]}$$

Dónde:

V: velocidad de la acumulación intracelular de Mn al tiempo t (mg Mn / g biomasa. h).

$V_{m\acute{a}x.}$: velocidad máxima de la acumulación intracelular de Mn (mg Mn / g biomasa. h).

K_m : concentración de Mn a la cual se obtiene la mitad de la velocidad máxima de acumulación intracelular (mg/L).

[Mn]: Concentración de Mn en la solución (mg/L).

3.10 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, para cada experimento, evaluando las diferencias presentadas en la eficiencia de remoción, absorción y adsorción del Mn^{2+} , así como de la alteración de la producción de pigmentos fotosintéticos asociados a la alteración en el crecimiento de *L. minor* y *Chlorella sp*, frente al efecto de los tratamientos y en el tiempo. Para las variables que presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$), se realizó la prueba 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) (ANEXO B).

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, %bioremovición (ln), %absorción (Box-Cox), y clorofilas totales ($\log (x+1)$); y en el experimento con *Chlorella sp*, %absorción (Box-Cox), %adsorción (ln) y clorofilas totales (Box-Cox).

4. RESULTADOS

Caracterización del agua

Se evaluó una concentración inicial (Ci) del Mn^{2+} en el agua residual de 1,1367 mg/l; de igual manera, se pudo evaluar la presencia de hierro (Fe) a una concentración de 0,134 mg/l y otros compuestos como nitratos, nitritos y fósforo total (Tabla 1).

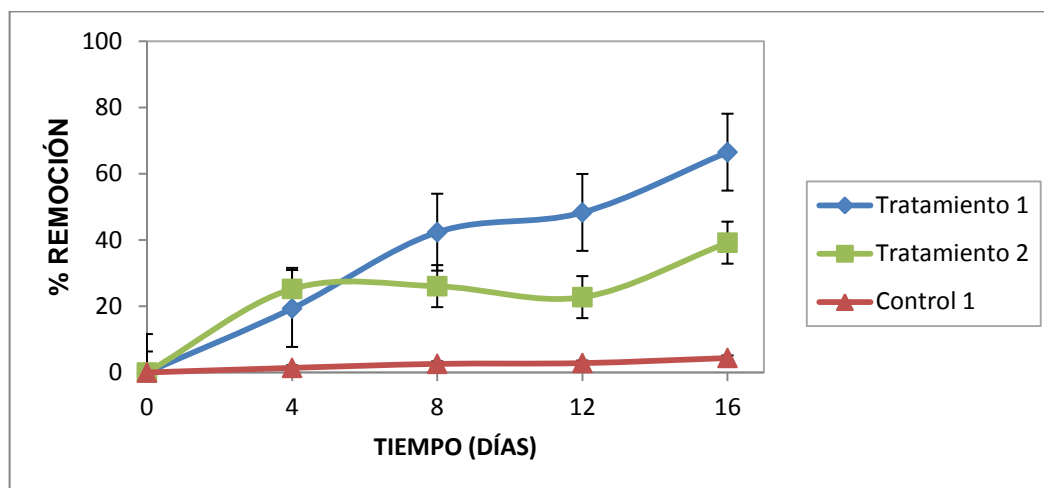
Tabla 1. Caracterización preliminar del agua residual.

Parámetro	Valoración	Método
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
Manganeso (mg Mn/L)	1,1367	Absorción atómica – SM 3111 B
Hierro Total (mg Fe/L)	0,134	Espectrofotométrico – SM 3500 - Fe

Primera etapa del proceso, *L. minor*.

Se obtuvo una mayor remoción del Mn^{2+} (66,47%) en el tratamiento T1 (agua residual sin esterilizar), remoción que se incrementó durante el tiempo de exposición; frente a un valor de 39,16% en T2 (agua residual esterilizada), donde se pudo observar una etapa durante el día 4 al día 12, en donde la capacidad de remoción se estabilizó para este organismo; por lo tanto, se puede afirmar que *L. minor*, presentó una significativa tolerancia a la Ci del Mn^{2+} (Figura 3).

Figura 3. Porcentaje de Remoción de Mn^{2+} con *L. minor* durante el tiempo de exposición.



Cinética de eliminación con *L. minor*.

Los datos se evaluaron a través de las ecuaciones cinéticas de primer y segundo orden. Los resultados obtenidos muestran que la remoción de Mn^{2+} usando *L. minor*, se ajusta mejor a un modelo cinético de eliminación de primer orden (Tabla 2); de esta manera se observa que *L. minor* remueve 0.0658 mg de Mn^{2+} / día en el T1 y 0.024 mg Mn^{2+} / día en el T2 (Tabla2).

Tabla 2. Constantes de velocidad de la eliminación de Mn^{2+} (k) en agua residuales con *L. minor* usando dos diferentes modelos cinéticos.

TRATAMIENTO 1				
Cinética de Eliminación Co= 1.1367 (mg/L)	Cinética de Primer Orden		Cinética de Segundo Orden	
	K (1/Días)	R ²	K (g/mg D)	R ²
	0,0658	0,9735	0,1025	0,9151
TRATAMIENTO 2				
Cinética de Eliminación Co= 1.1367 (mg/L)	Cinética de Primer Orden		Cinética de Segundo Orden	
	K (1/Días)	R ²	K (g/mg D)	R ²
	0,024	0,7337	0,0274	0,7411

Los resultados obtenidos mostraron claramente que la mayor cantidad de Mn^{2+} eliminado de las unidades experimentales contenidas de agua residual fue por el sistema de adsorción a la superficie de la biomasa (31.22% para T1 y 41.56 % para T2) (Figura 4), sin embargo, el Mn^{2+} fue acumulado en las células en una menor proporción en los tratamientos (22.12% para T1 y 16,79% para T2) (Figura 5).

Figura 4. Porcentaje de Adsorción de Mn^{2+} , mediante el cultivo de *L. minor*.

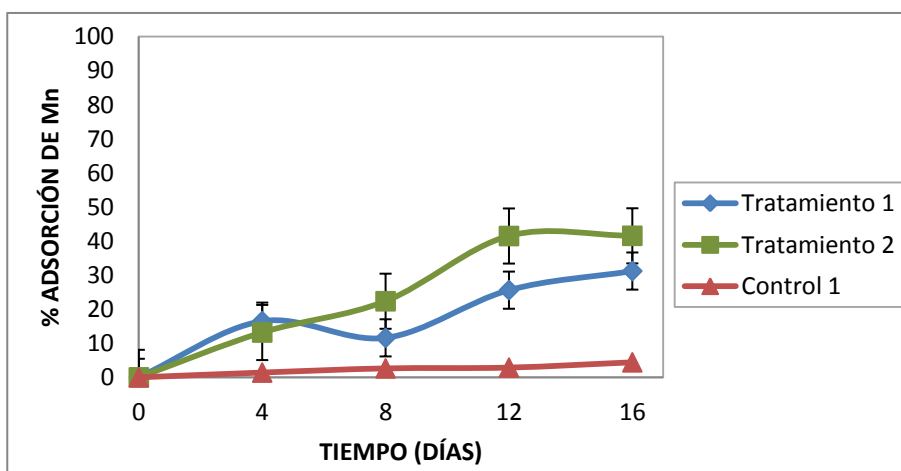
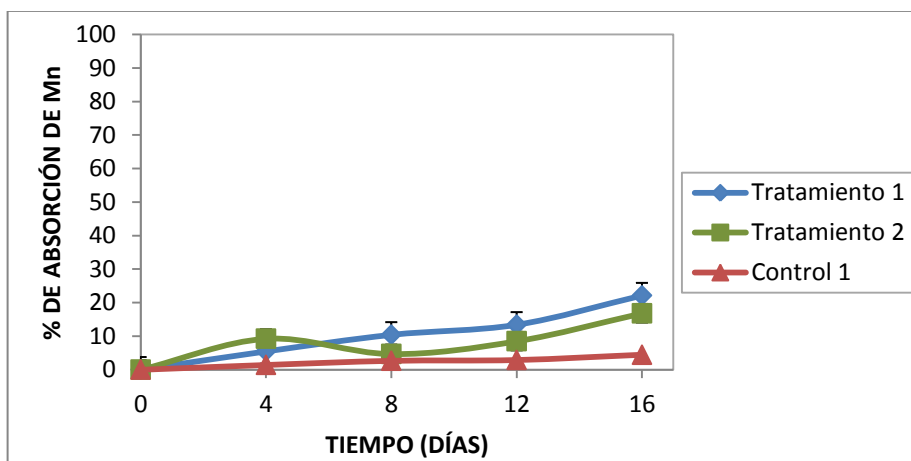


Figura 5. Porcentaje de Absorción de Mn^{2+} , mediante el cultivo de *L. minor*.



Cinética de Adsorción.

Los resultados obtenidos muestran que la cinética de adsorción se ajustó mejor para el modelo de primer orden (Tabla 3); los coeficientes de determinación R^2 para el T1 en ambos modelos fueron bajos. Se determinó que *L. minor* adsorbió 0,0989 mg de Mn^{2+} / día en el T1 y 0,18 mg de Mn^{2+} / día en el T2.

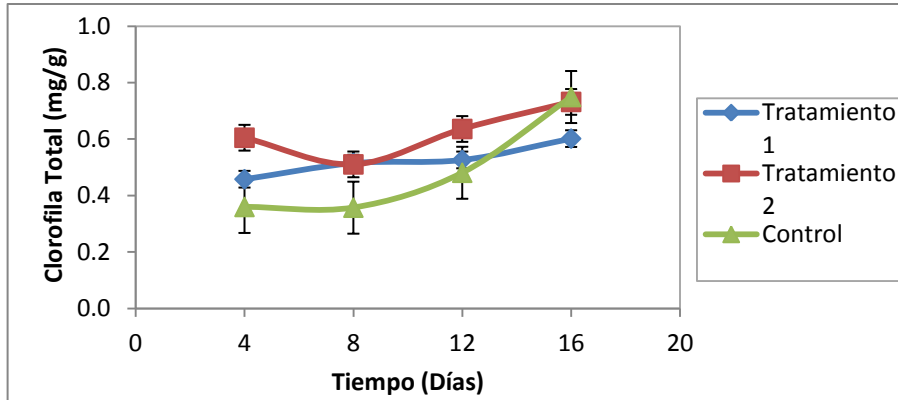
Tabla 3. Constantes de velocidad de la adsorción de Mn^{2+} (k) en agua residuales con *L. minor* usando dos diferentes modelos cinéticos.

TRATAMIENTO 1				
Cinética de Adsorción	Cinética de Primer Orden		Cinética de Segundo Orden	
	K (1/Días)	R^2	K (g/mg D)	R^2
	0,0989	0,7227	0,2144	0,7211
TRATAMIENTO 2				
Cinética de Adsorción	Cinética de Primer Orden		Cinética de Segundo Orden	
	K (1/Días)	R^2	K (g/mg D)	R^2
	0,18	0,9849	0,1141	0,8775

Efecto del Mn^{2+} en el crecimiento de *L. minor*.

Se observó que la concentración de Mn^{2+} presente en el agua residual estimuló el incremento en la concentración de las clorofilas totales y del crecimiento de *L. minor* durante el procedimiento realizado. En el T1 la clorofila total mantuvo un aumento, al igual que en el T2, sin embargo, se observó un aumento de clorofila después del día 8 de exposición, lo que se vio reflejado en la capacidad de bioremediación de *L. minor* (Figura 6). Ambos tratamientos siguieron el patrón de crecimiento de *L. minor*, el cual se observa en el control 2.

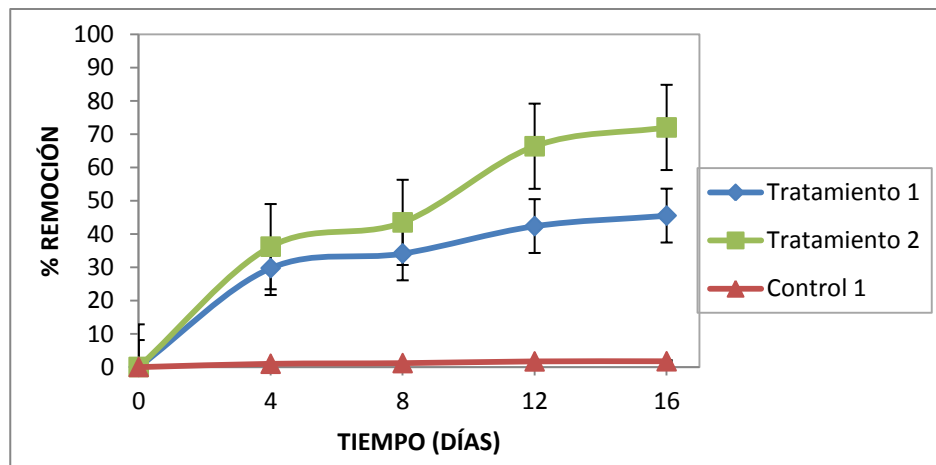
Figura 6. Efecto del Mn^{+2} en la clorofila total (mg/g) de *L. minor*.



Segunda etapa del proceso, *Chlorella sp.*

El experimento inició bajo una Ci: 0,3812 mg/L y 0,6915 mg/L para el T1 y T2, respectivamente. Hay que recordar, que dichas concentraciones de Mn^{2+} , corresponden a la concentración remanente después del proceso inicial realizado previamente por *L. minor*. En este estudio se obtuvo una mayor remoción del Mn^{2+} en el T2 (71.98%), frente al T1 (45.49 %); Para ambos casos se observó que la capacidad de remoción de Mn^{2+} se mantuvo constantes durante el periodo de exposición; por lo tanto, *Chlorella sp* presentó una significativa tolerancia a las Ci del Mn^{2+} en el agua residual después del experimento con *L. minor* (Figura 7).

Figura 7. Porcentaje de Remoción de Mn^{2+} con *Chlorella sp* durante el tiempo de exposición.



Cinética de eliminación con *Chlorella sp.*

Los resultados obtenidos arrojan coeficientes de determinación similares, sin embargo, la velocidad de eliminación de la cinética de primer orden fue la que se ajustó mejor al desarrollo del experimento. *Chlorella sp* elimina 0,0353 mg/día para T1 y 0,0796 mg/día para el T2 (Tabla 4).

Tabla 4. Constantes de velocidad de eliminación de Mn^{2+} (k) en agua residuales con *Chlorella sp*, usando dos diferentes modelos cinéticos.

TRATAMIENTO 1				
Cinética de Eliminación Co= 0,3812 (mg/L)	Cinética de Primer Orden		Cinética de Segundo Orden	
	K (1/Días)	R ²	K (g/mg D)	R ²
	0,0353	0,8779	0,1187	0,9271
TRATAMIENTO 2				
Cinética de Eliminación Co= 0,6915 (mg/L)	Cinética de Primer Orden		Cinética de Segundo Orden	
	K (1/Días)	R ²	K (g/mg D)	R ²
	0,0796	0,9698	0,2142	0,9527

Los resultados obtenidos mostraron claramente que la mayor cantidad de Mn^{2+} eliminado fue encontrado en la acumulación intracelular (50.21%) para T1 y (23.58%) para T2 (Figura 8). Por el contrario el Mn^{2+} adsorbido se presentó en una menor proporción (27.30%) para el T1 y (22.94 %) para el T2, (Figura 9).

Figura 8. Porcentaje de Adsorción de Mn^{2+} con *Chlorella sp*, durante el tiempo de exposición.

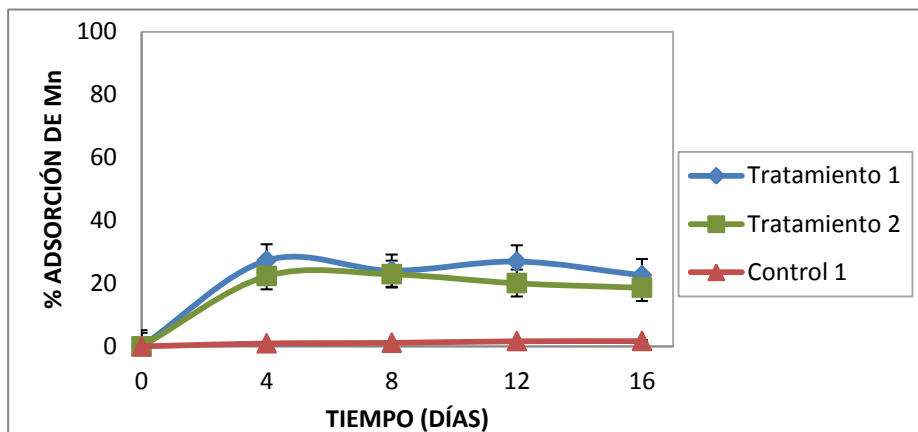
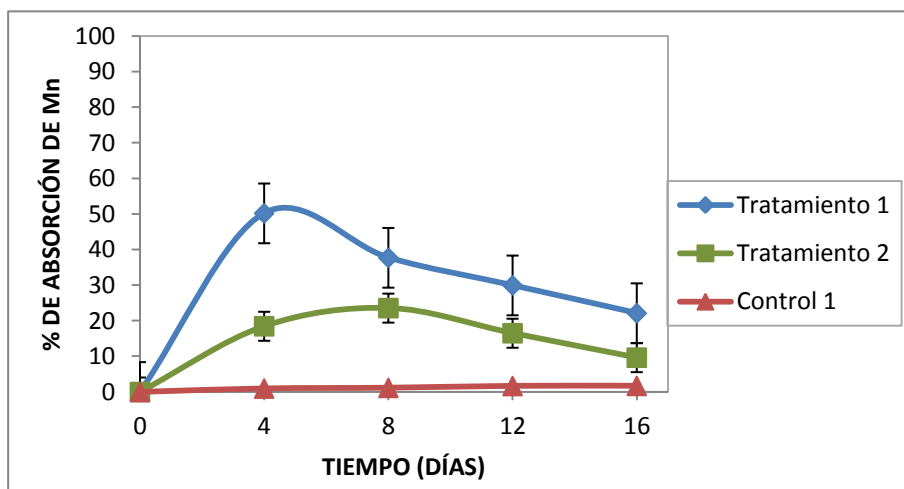


Figura 9. Porcentaje de Absorción de Mn^{2+} con *Chlorella sp.*, durante el tiempo de cultivo.



Cinética de acumulación intracelular con *Chlorella sp.*

Debido a que el metal absorbido intracelularmente a la biomasa es el mecanismo que predomina en la bioremoción de *Chlorella sp.* evaluada, se aplicó el modelo de Michaelis–Menten para determinar la cinética de acumulación intracelular, observándose que el ajuste a este modelo es aceptable, además se determinó que *Chlorella sp.* puede acumular 0,00594 mg/g por día para el T1, y 0,01496 mg/g por día para el T2 (Tabla 5).

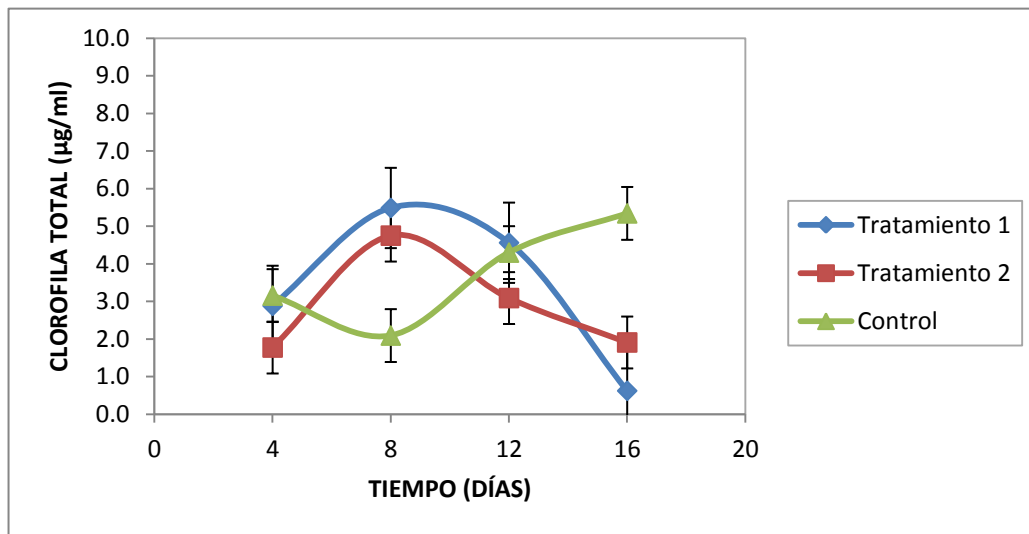
Tabla 5. Constantes de velocidad de la absorción de Mn^{2+} (k) en agua residuales con *Chlorella sp.*

TRATAMIENTO 1			
Cinética de Acumulación Intracelular	Cinética de Michaelis–Menten		
	K (mg/L)	R ²	Vmax (mg/g-Día)
	0.38820	0.9271	0.0059
TRATAMIENTO 2			
Cinética de Acumulación Intracelular	Cinética de Michaelis–Menten		
	K (mg/L)	R ²	Vmax (mg/g-Día)
	0.95283	0.9527	0.01496

Efecto del Mn^{2+} en el crecimiento de *Chlorella sp.*

Debido a la disminución en la concentración de Mn^{2+} en el agua residual por la remoción previa de *L. minor* el crecimiento de *Chlorella sp* disminuyó a partir del día 8 del tiempo de exposición para ambos tratamientos (Figura 10). Para el control 2 en condiciones de no contaminación, *Chlorella sp* presentó un crecimiento sin alteraciones, a través del tiempo de exposición.

Figura 10. Efecto del Mn^{2+} en la clorofila total ($\mu\text{g/ml}$) de *Chlorella sp.*



5. DISCUSIÓN

Durante el tiempo de estudio de la bioremediación de Mn^{2+} con *L. minor*, se logró observar una remoción significativa mayor en el T1, en comparación con el T2. *Sánchez Galván et al.* [35], obtuvo hasta un 100% de remoción de metales en un sistema de agua residual sintética, comparado a un 96% de un sistema de agua esterilizada, mediante un cultivo con *S. minima*. A pesar que nuestro estudio, no reportó datos tan eficientes debido a que se trabajó con agua residual industrial (no sintética), y la remoción de un metal con un cultivo diferente, se pudo comparar que el tratamiento que predomina en la remoción es el T1 (Tabla 6)

Tabla 6. Porcentajes de Adsorción, Absorción y Bioremediación en el T1 y T2 con los cultivos *L. minor* y *Chlorella sp* durante el periodo de exposición.

	Tratamiento 1							
	<i>Lemna minor</i>				<i>Chlorella sp</i>			
	Día 4	Día 8	Día 12	Día 16	Día 4	Día 8	Día 12	Día 16
% de Adsorción	16,51	11,6	25,61	31,22	27,3	24,04	26,97	22,6
% de Absorción	5,42	10,41	13,39	22,12	50,21	13,84	10,99	8,13
% Bioremediación	19,31	42,33	48,29	66,47	29,72	34,13	42,35	45,49

	Tratamiento 2							
	<i>Lemna minor</i>				<i>Chlorella sp</i>			
	Día 4	Día 8	Día 12	Día 16	Día 4	Día 8	Día 12	Día 16
% de Adsorción	13,18	22,36	41,51	41,56	22,36	22,94	20,10	18,67
% de Absorción	9,22	4,67	8,49	16,79	18,48	23,58	16,52	9,66
% Bioremediación	25,21	26,05	22,74	39,16	36,15	43,45	66,32	71,98

Hurd y Sternberg [37], reportaron una eliminación de 86% en un periodo de 24 h en un sistema por lote utilizando *L. minor* a una C_i de 5 mg Pb^{2+} /L obteniendo velocidades de eliminación de 0.1791 mg/L por hora. Para el presente trabajo se reportaron porcentajes de remoción y velocidades de eliminación

significativamente menores; esto es debido a que el agua residual utilizada en nuestro experimento poseía un sistema multi-metal, lo cual retardo de manera gradual la remoción de Mn^{2+} , este resultado puede ser consistente con lo encontrado por *Miretzky et al.* [44], donde al utilizar sistemas multi-metales (5 metales: Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Cr^{3+}) obtuvieron menores ajustes cinéticos para la velocidad de eliminación.

Estudios realizados por *Olgún et al.* [29], con plantas macrófitas reportaron que gran parte de la bioremediación, corresponde al mecanismo de adsorción, donde obtuvieron resultados de 54% de adsorción utilizando como cultivo *S. minima*. *Sánchez-Galván et al.* [35], reportan porcentajes de adsorción de Pb^{2+} de 41%, *Benaroya et al.* [44], utilizando un helecho acuático (*Azolla filiculoides*) obtuvieron porcentajes de 37%, De igual manera en nuestro estudio predominó el mecanismo de adsorción para el cultivo de *L. minor* (Tabla 6).

Keskinkan et al. [45], reportó que para *Ceratophyllum demersum*, la ecuación de primer orden no fue apropiada para todos los resultados, sólo para algunos datos. La ecuación de segundo orden por el contrario, sí fue aplicable para todos los datos. Resultados similares fueron encontrados en la cinética de adsorción por la biomasa no viable de *Azolla filiculoides* pre-tratada con NaOH, obteniendo un mayor ajuste a un modelo de segundo orden [46]. Se recomienda realizar un estudio cinético donde existan cambios significativos crecientes de las concentraciones de metal adsorbido [35]. Éste estudio cinético fue evaluado a lo largo de todo nuestro experimento, donde se presentaron fases crecientes como decrecientes, además, se observa con claridad que la velocidad de adsorción fue mayor en el T2 (Tabla 3). La cinética no se ajustó de manera satisfactoria; no obstante el modelo más aceptable fue el de primer orden.

Chlorella sp puede eliminar el Mn^{2+} presente en aguas residuales de manera eficiente (56,5% a 100%) a concentraciones de 0.29 mg Mn^{2+} /L y 2,7 mg Mn^{2+} /L

[38]. En este estudio, se obtuvo un porcentaje de remoción de Mn^{2+} del 45,49% T1 y 71,98% para el T2, a concentraciones de 0,3812 mg Mn^{2+} /L y 0,6915 mg Mn^{2+} /L, respectivamente, donde prevaleció la acumulación intracelular con respecto a la adsorción (Tabla 6). Caso contrario ocurrió en el estudio realizado por *Abalde et al.* [39], el cual se reportó para la microalga *P. tricornutum*, alcanzaba remociones del 90% a través de la adsorción, frente a remociones por acumulación intracelular (absorción) con valores menores al 10%. Estas diferencias se deben a que diferentes especies de algas tienen diferentes tamaños, formas y composiciones de la pared celular, que afectan la eficiencia de la unión al metal [38].

El modelo cinético de Michaelis–Menten ha sido usado para inferir el mecanismo responsable del transporte de metales a través de la membrana plasmática [34]. De acuerdo a los coeficientes de determinación, en el presente estudio se determinó que la absorción con *Chlorella sp* se ajusta a dicho modelo [48]. *Garnham et al.* [40], reportaron que la velocidad de acumulación intracelular de metales por microalgas se puede presentar en dos fases, rápidas y lentas, afirmación que se ve reflejada en nuestro experimento donde se presentó un mayor porcentaje de absorción durante los primeros días de exposición tanto para el T1 como para el T2 (Figura 8), éste suceso se presenta porque hay más de un mecanismo implicado en el proceso de remoción como lo es la adsorción [47].

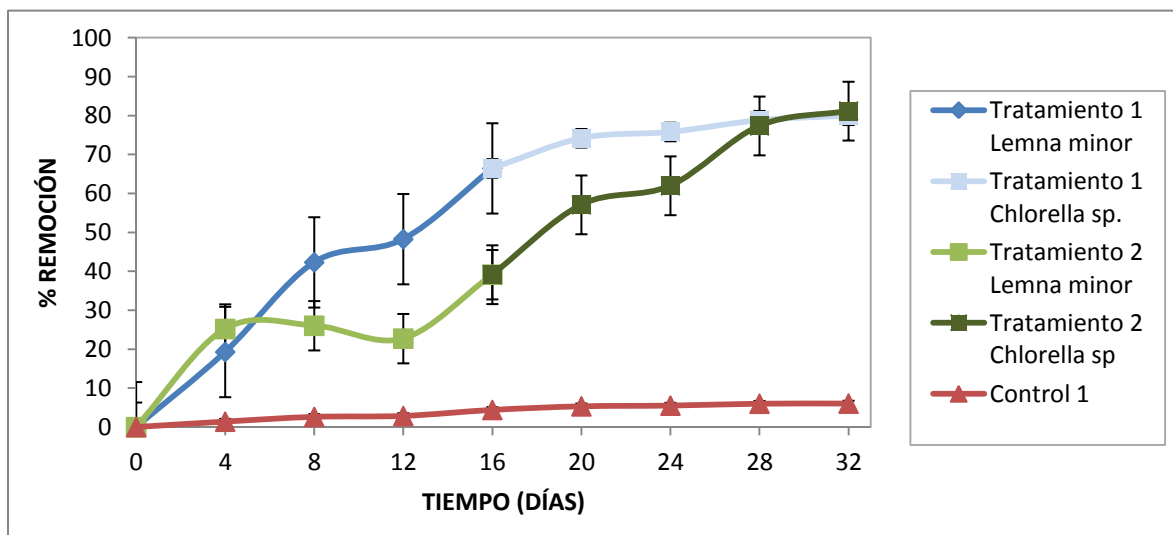
Doganlar et al. [49], reportaron que *L. gibba* es una especie con características morfológicas, fisiológicas y con un hábito de crecimiento muy parecida a *L. minor*, además presentaron que esta se vio afectada por la exposición a Mn^{2+} y Ni [41]. Esta situación se comprueba con los datos obtenidos en nuestro estudio, donde se detectó un incremento en la clorofila total de *L. minor* durante el transcurso del tiempo de exposición (Figura 6). De esta manera se puede afirmar que el Mn^{2+} juega un papel importante como precursor de clorofilas en *L. minor*, resultados que corresponden a los descritos por *Rezai K.* [36]. Por otro lado, debido al déficit en la

concentración de Mn^{2+} por la remoción previa de *L. minor* y a los niveles necesarios para satisfacer las necesidades de la microalga, el crecimiento del cultivo se reduce significativamente, fenómeno que se ve reflejado en la disminución de la clorofila total en *Chlorella sp* (Figura 10).

La bioremoción en un sistema complementario entre *L. minor* y *Chlorella sp* (Figura 9), determinó una remoción total de Mn^{2+} de aproximadamente 80% para ambos tratamientos. En el T1, *L. minor* tuvo un incremento de remoción el cual se hizo notorio a partir del día 4; esto se debió a que posiblemente, se presentó el crecimiento de diferentes organismos, los cuales pudieron realizar un proceso de remoción de Mn^{2+} .

En el T2, ambos cultivos presentaron una remoción similar de Mn^{2+} (Tabla 7). En el T1, *Chlorella sp* realizó una eliminación de Mn^{2+} inferior a la realizada por *L. minor*, posiblemente esto se debe a que *Chlorella sp* se encontraba en un ambiente de competencia con otros microorganismos por sobrevivir.

Figura 11. Bioremoción total de Mn^{2+} , para un sistema complementario, *L. minor* y *Chlorella sp*.



Los resultados obtenidos (Figura 11), establecen la viabilidad de un sistema en conjunto entre *Lemna minor* y *Chlorella sp* actuando de forma consecutiva, más eficaz. Procedimiento que es satisfactorio a lo propuesto por *Bouali et al.* [50].

Tabla. 7 Porcentaje de bioremediación total.

	<i>Lemna minor</i>	<i>Chlorella sp</i>	% Bioremediación Total
% Bioremediación T1	66.47	13.6	80.07
% Bioremediación T2	39.16	42.01	81.17

6. CONCLUSIONES

- La implementación de un sistema complementario de *Lemna minor* y *Chlorella sp*, tiene el potencial de bioremediar el Mn^{2+} presente en aguas residuales hasta un 80%, siendo más eficiente para la eliminación de contaminantes del medio ambiente.
- *L. minor* presentó una gran tolerancia a la Ci del Mn^{2+} , una gran capacidad de competir con otros organismos presentes en el agua sin esterilizar, y una significativa capacidad para remover Mn^{2+} .
- La eliminación de manganeso en aguas residuales, en un sistema con *L. minor* y *Chlorella sp*, se puede predecir a través de un modelo cinético de primer orden.
- *L. minor* emplea como principal mecanismo de remoción su significativa capacidad de adsorción; y en el caso de *Chlorella sp*, su significativa capacidad de acumulación intracelular.
- Se demostró la influencia de la concentración de manganeso en el crecimiento de la biomasa.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar el procedimiento donde se incluya la inmovilización de la biomasa, para alcanzar, posiblemente un mayor rendimiento en la bioremoción de metales en aguas residuales.
- Evaluar los diferentes tipos de modelos cinéticos para los días donde se presente una fase de crecimiento en la biomasa para aumentar los coeficientes de determinación y así lograr un mejor ajuste en la evaluación de la cinética.
- Evaluar la remoción del Mn bajo diferentes densidades de inóculo y evaluar la concentración o densidad más efectiva

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] MONTAZER-RAHMATI, M.M., RABBANI, P., ABDOLALI, A., KESHTKAR, A.R. Kinetics and equilibrium studies on biosorption of cadmium, lead, and nickel ions from aqueous solutions by intact and chemically modified brown algae. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, vol. 185, p. 401–407.

[2] MALDONADO SALAZAR, R., PÉREZ SARMIENTO, O. J., y TLAHUIZO GONZÁLEZ, M., Evaluación del nivel de sensibilidad en los habitantes de las delegaciones: Magdalena Contreras, Milpa Alta y Tláhuac. Tesina. México, D.F.: Universidad autónoma y metropolitana. División de ciencias sociales y humanidades. 2006. 622p.

[3] RAUT N., CHARIF G., AMAL, A., SHINOONA, A., ABRAR, A., A Critical Review of Removal of Zinc from Wastewater, *Proceedings of the World. Congress on Engineering*, 2012, vol. 1, p. 1–4.

[4] BULGARIU D., BULGARIU L., Equilibrium and kinetics studies of heavy metal ions biosorption on green algae waste biomass. *Bioresource Technology*, 2012, vol. 103, p. 489–493.

[5] AKSU, Z., DÖNMEZ, G., Binary biosorption of cadmium (II) and nickel (II) onto dried *Chlorella vulgaris*: co-ion effect on monocomponent isotherm parameters. *Proc Biochem* 2006, Vol. 41 p. 860–868.

[6] 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].

[7] NEAL, BG., LAWRENCE, EB., WENDT, JL., Alkali metal partitioning in Ash from pulverized coal combustion. *Combust.Sci*, 1990, Vol. 74, p. 211 –214.

[8] ALARCÓN CORREDOR, O. M., Los elementos traza. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa - ULA*, 2009, vol. 4, p. 07–124.

[9] BUCHANAN B, GRUSEN W, JONES R., *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society. of Plant Physiologists, Maryland, 2000., p. 1367.

[10] DOGANLAR ZB, CAKMAK S, YANIK T. Metal Uptake and Physiological Changes in *Lemna gibba* Exposed to Manganese and Nickel. *International Journal of Biology*, 2000, Vol. 3 p. 148-157.

[11] 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.

[12] 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. 6, p. 454-458.

[13] HOWARD, T. O., *Heavy metals in the environment, using wetlands for their removal*. Lewis publishers. 2000, p. 31–48.

[14] LOURIE E., PATIL VISHWANATH, G. E., Efficient Purification of Heavy-Metal-Contaminated Water by Microalgae-Activated Pine Bark. *Water Air Soil Pollut*, 2009, p. 493–500.

[15] ARMSTRONG, W. Wayne's Word Lemnaceae [En línea]. 2003. Disponible en internet: www.waynesword.palomar.edu

- [16] ROOK, E., Flora, fauna, earth and sky. The natural history of the northwoods. [En línea]. 2002. Disponible en internet:
www.rook.org/earl/bwca/nature/aquatics/lemna.html
- [17] LEVY, J. L., STAUBER, J. L., JOLLEY, D. F., Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. Science of the Total Environment, 2007, vol. 387, p. 141–154.
- [18] MUÑOZ, R., GUIEYSSE, B., Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. Water research, 2006, vol. 40, 2799 – 2815.
- [19] LÓPEZ MARTÍN, M., Biorremediación de metales pesados con aislados microbianos procedentes de procesos de compostaje. Trabajo fin máster en biotecnología industrial y agroalimentaria. Almería España. Universidad de Almería. Facultad de ciencias experimentales, 2011, 23 p.
- [20] EWEIS, J. B., ERGAS, S. J., CHANG, D. P. Y. y SCHROEDER, E. D. Principios de biorrecuperación. Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos. 1999, Ed. Mc GrawHill, Madrid.
- [21] VULLO, D. L. Microorganismos y metales pesados: interacción en beneficio del medio ambiente. Química Viva, 2003. Vol. 2, p. 93-104
- [22] GLASS, D.J. Economic potential of phytoremediation. Phytoremediation of Toxic Metals Raskin I & Ensley BD (Eds) John Wiley & Sons, New York, USA. 2000, p.15–31.

[23]. CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O., Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. Revista Latinoamericana de Microbiología, 2000, Vol. 42, p.131-143.

[24]. HOLAN, Z. R. y VOLESKY B., Accumulation of cadmium, lead, and nickel by fungal and wood biosorbents. Appl. Biochem. Biotechnol, 1995, Vol. 53, p.133-146

[25]. GREENE, B., M. HOSEA, R. MCPHERSON, M. HENZL, M.D. A. y D.W. DARNALL. Interaction of gold (I) and gold (II) complexes with algal biomass. Environ. Sci. Technol. 1986, Vol. 20, p.627-632.

[26] McMURRY, J. Fundamentals of Organic Chemistry (5 ed.). Agnus McDonald. 2003, p. 409.

[27] MARCOVECCHIO, J.E.; MORENO, V.J. & A. PEREZ. Metal accumulation in tissues of sharks from the Bahía Blanca Estuary, Argentina. Marine Environmental Research, 1991. Vol. 31, p. 263-274.

[28] SÁNCHEZ-GALVÁN, G., GONZÁLEZ-PORTELA, E., OLGUÍN, E.J. Lead biosorption by nonliving *Salvinia minima* biomass in batch systems. VIII International Symposium on Environmental Biotechnology. Leipzig, Germany. 2006, July 9-13.

[29] OLGUÍN, E.J., SÁNCHEZ-GALVÁN, G., PÉREZ-PÉREZ, T. y PÉREZ-OROZCO, A. Surface adsorption, intracellular accumulation and compartmentalization of lead in batch operated lagoons with *Salvinia minima* as affected by environmental conditions, EDTA and nutrients, J Ind. Microbial & Biotechnol, 2005, vol. 32, p. 577–586.

[30] LICHTENTHALER, H.K. Photosynthesis, respiration, and chlorophylls in presenescent, regreened, and senescent leaves of forest herb *Smyrniurn perfoliatum* L. 1987, vol.20, p.173–178.

[31] WILEY, & Sons, Inc., Handbook of Food Analytical Chemistry. United States of America, 2005, pag.171

[32] LAZARIDIS, N. K. y ASOUHIDOU, D. D. Kinetics of sorption removal of chromium (VI) from aqueous solutions by calcined Mg–Al–CO₃ hydrotalcite. *Water Research*, 2003, vol. 124, p. 2875–2882.

[33] HO, Y. S. y McKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochem*, 1999, vol. 34, p. 451–465.

[34] ABEDIN, M. J., FELDMANN, J., y MEHARG, A. Uptake kinetics of arsenic species in rice plants. *Plant Physiol*, 2002, vol. 128, p. 1120–1128.

[35] SANCHEZ-GALVAN, G., MONROY, O., GOMEZ, J., OLGUÍN, E. J., Assessment of the Hyperaccumulating Lead Capacity of *Salvinia minima* Using Bioadsorption and Intracellular Accumulation Factors, 2008, vol. 194, p. 77–90.

[36]. 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, p. 454-458.

[37]. HURD, N.A., STERNBERG, S.P. K. Bioremoval of Aqueous Lead Using *Lemna minor*. *Internat J Phytoremediat*, 2008, Vol. 10, p. 278-288.

- [38]. 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, 2009.
- [39]. ABALDE, J., A. CID, P. FIDALGO, TORRES, E., HERRERO, C., *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. España, Universidad de La Coruña, Monografías, 1995, Vol.26, p. 210.
- [40]. GARNHAM, G. W., CODD, G. A. GADD, G. M. Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella salina*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 1992, Vol. 37, p. 270-276.
- [41]. HART, I, VINCENT, A, WILLISON, H. Neuromyotonia and antiganglioside-associated neuropathies. In: Engel AG, editor. *Myasthenia gravis and myasthenic disorders*, New York: Oxford University Press; 1999, p. 229–50.
- [42]. ZEYNEP, B. D., SEHER, C., TELAT, Y., *Metal Uptake and Physiological Changes in *Lemna gibba* Exposed to Manganese and Nickel*, 2012.
- [43]. MIRETZKY, P., SARALEGUI, A. y FERNÁNDEZ-CIRELLI, P. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina), *Chemosphere* 57, 2004, Vol. 8, p. 997–1005.
- [44]. BENAROYA, R.O., TZIN, V., TEL-OR, E., ZAMSKY, E., Lead accumulation in the aquatic fern *Azolla filiculoides*. *Plant Physiol Bioch*, 2004. Vol. 42, p. 639-645.
- [45]. KESKINKAN, O., GOKSU, M., BASIBUYUK, M. y FORSTER, C.F. Heavy metal adsorption properties of a submerged aquatic plant (*Ceratophyllum demersum*). *Bioresource Technol*, 2004, Vol. 2, p. 197-200.

- [46]. RAKHSHAE, R., KHOSRAVI, M. y GANJI, M.T. Kinetic modeling and thermodynamic study to remove Pb(II), Cd(II), Ni(II) and Zn(II) from aqueous solution using dead and living *Azolla filiculoides*. J Hazard Mater, 2006, Vol. 134, p. 120–129.
- [47]. GREENE B, DARNALL DW,, Microbial oxygenic photoautotrophs (cyanobacteria and algae) for metal-ion recovery. In: Ehrlich HL, Briedey CL (eds) Microbial mineral recovery. McGraw-Hill, New York, 1990, p. 227-302.
- [48]. SUNDA, W. G., HUNTSMAN, S. A., Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. The Science of the Total Environment, 1998, vol. 219. p.165-181.
- [49]. DOGANLAR, Z. B., CAKMAK, S., YANIK T., 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.
- [50]. BOUALI, M., ZRAFI, I., MOUNA, F., BAKHROUF, A., Pilot study of constructed wetlands for tertiary wastewater treatment using duckweed and immobilized microalgae. African Journal of Microbiology Research, 2012, Vol. 6, No. 31, p. 6066-6074.

BIBLIOGRAFIA

BOUALI, M., ZRAFI, I., MOUNA, F., BAKHROUF, A., Pilot study of constructed wetlands for tertiary wastewater treatment using duckweed and immobilized microalgae. African Journal of Microbiology Research, 2012, Vol. 6, No. 31, p. 6066-6074.

BULGARIU D., BULGARIU L., Equilibrium and kinetics studies of heavy metal ions biosorption on green algae waste biomass. Bioresource Technology, 2012, vol. 103, p. 489–493.

CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O., Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. Revista Latinoamericana de Microbiología, 2000, Vol. 42, p.131-143.

DOGANLAR ZB, CAKMAK S, YANIK T. Metal Uptake and Physiological Changes in *Lemna gibba* Exposed to Manganese and Nickel. International Journal of Biology, 2000, Vol. 3 p. 148-157.

HO, Y. S. y McKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. Process Biochem, 1999, vol. 34, p. 451–465.

HOWARD, T. O., Heavy metals in the environment, using wetlands for their removal. Lewis publishers. 2000, p. 31–48.

HURD, N.A., STERNBERG, S.P. K. Bioremoval of Aqueous Lead Using *Lemna minor*. Internat J Phytoremediat, 2008, Vol. 10, p. 278-288.

MIRETZKY, P., SARALEGUI, A. y FERNÁNDEZ-CIRELLI, P. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina), *Chemosphere* 57, 2004, Vol. 8, p. 997–1005.

OLGUÍN, E.J., SÁNCHEZ-GALVÁN, G., PÉREZ-PÉREZ, T. y PÉREZ-OROZCO, A. Surface adsorption, intracellular accumulation and compartmentalization of lead in batch operated lagoons with *Salvinia minima* as affected by environmental conditions, EDTA and nutrients, *J Ind. Microbial & Biotechnol*, 2005, vol. 32, p. 577–586.

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. 6, p. 454-458.

VULLO, D. L. Microorganismos y metales pesados: interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*, 2003. Vol. 2, p. 93-104

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, 2009.

Anexo A. NORMATIVIDADES AMBIENTALES POR EL DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO DE MEDIO AMBIENTE PARA EL VERTIMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Resolución No 1074 del 28 de Octubre de 1997

Artículo 3º. Todo vertimiento de residuos líquidos a la red de alcantarillado público y/o a un cuerpo de agua, deberá cumplir con los estándares establecidos en la siguiente tabla:

PARAMETRO	EXPRESADA COMO	NORMA (mg/l)
Arsénico	As (mg/l)	0,1
Bario	Ba (mg/l)	5,0
Cadmio	Cd (mg/l)	0,003
Carbonatos	Agente Activo (mg/l)	0,1*
Cianuro	CN (mg/l)	1,0
Cinc	Zn (mg/l)	5,0
Cloroformo Extracto de carbón	ECC (mg/l)	1,0
Cobre	Cu (mg/l)	0,25
Compuestos fenólicos	Fenol (mg/l)	0,2
Compuestos Organoclorados	Concentración de agente Activo	0,05*
Compuestos Organofosforados	Concentración de agente Activo	0,1*
Cromo hexavalente	Cr+6 (mg/l)	0,5
Cromo total	Cr total (mg/l)	1,0
DBO ₅	(mg/l)	1000*
Dicloroetileno	Dicloroetileno	1,0
Difenil Policlorados	Concentración de agente Activo	ND**
DQO	(mg/l)	2000
Grasas y Aceites	(mg/l)	100
Manganeso	Mn (mg/l)	0,12
Mercurio	Hg (mg/l)	0,02
Mercurio orgánico	Hg (mg/l)	ND**
Níquel	Ni (mg/l)	0,2
PH	Unidades	5-9
Plata	Ag (mg/l)	0,5
Plomo	Pb (mg/l)	0,1
Selenio	Se (mg/l)	0,1
Sólidos Sedimentables	SS (mg/l)	2,0
Sólidos Suspendidos Totales	SST (mg/l)	800
Sulfuro de carbono	Sulfuro de carbono (mg/l)	1,0
Tetracloruro de carbono	Tetracloruro de carbono (mg/l)	1,0
Tricloroetileno	Tricloroetileno (mg/l)	1,0
Temperatura	Grados Centígrado °C)	<30°
Tensoactivos (SAAM)	(mg/l)	0,5

* Concentración de tóxico que produce la muerte del organismo.

** Se entenderá por valor No Detectable (ND) a la concentración de la sustancia que registra valores por debajo de los límites de detección empleando los métodos del manual Standard Method for Examination of Water and Wastewater (Última Edición).

Anexo B. TABLA ANOVA

ANOVA de dos vía, para la evaluación de la capacidad de bioremediación de Mn^{2+} , en *L. minor* y *Chlorella sp.* . * $P < 0,050$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. NS: No significativo.

Parámetro	ANOVA					Parámetro	ANOVA		
	Fuente de Variación	df	F	P	Fuente de Variación		Df	F	P
	<i>Lemna minor</i>					<i>Chlorella sp</i>			
% absorción	Tratamiento	1	1,168	***	% absorción	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		
% adsorción	Tratamiento	1	10,565	***	% adsorción	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		
% remoción	Tratamiento	1	13,539	***	% remoción	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		
Clorofilas totales	Tratamiento	2	14,195	***	Clorofilas totales	Tratamientos	2	43,347	***
	Tiempo (días)	3	25,257	***		Tiempo (días)	3	24,213	***
	TxT	6	4,170	***		TxT	6	25,688	***
	Error	60				Error	60		