

**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS,
BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS**

**PROGRAMA PROFESIONAL DE
INGENIERIA BIOTECNOLOGICA**



**REMOCION DE ARSENICO DE EFLUENTES INDUSTRIALES,
MEDIANTE BIOABSORCION CON *Chlorella vulgaris* A ESCALA DE
LABORATORIO**

**TESIS PRESENTADA POR LAS BACHILLERES
EN INGENIERIA BIOTECNOLOGICA:**

GALVAN JIMENEZ, KATHERIN GREISS
ROZAS LATORRE, HILDA GRACE

**PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL
DE INGENIERO BIOTECNOLOGO**

ASESOR:
MGTER. JULITZA PAREDES FUENTES.

**AREQUIPA – PERU
2013**

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado la vida para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor. A la Virgen María, porque al igual que al lado de su hijo Jesucristo, siempre ha estado conmigo brindándome su amor incondicional de madre. A mi papa. Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor. A mi madre, por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias de opiniones. A mi hija Kiara, por ser lo más grande y valioso que Dios me ha regalado, quien es mi fuente de inspiración y la razón que me impulsa a salir adelante. A mi esposo D'Angelo, que durante estos años de carrera ha sabido apoyarme para continuar y nunca renunciar, gracias por su amor incondicional. Agradezco también de manera especial a mi Director de Programa quién con sus conocimientos y apoyo supo guiar el desarrollo de la presente tesis desde el inicio hasta su culminación. Finalmente a Marcia y Ana Lucia, por ofrecerme siempre esa mano desinteresada y con el pasar del tiempo, de amigas incondicionales en todo momento. "Ahora puedo decir que todo lo que soy es gracias a todos ustedes"

Katherin Greiss Galvan Jimenez

DEDICATORIA

Por haberme dado la vida, estar siempre conmigo y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional, que me ha dado fortaleza para continuar cuando a punto de caer he estado; por ello, con toda la humildad que de mi corazón puede emanar, dedico primeramente mi trabajo a Dios.

A mi Padre Rodolfo, por ser el pilar más importante, demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional... porque a pesar de nuestra distancia física, siento que está conmigo siempre y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante, sé que este momento es tan especial para él como lo es para mí.

A mi familia en general Viviana, Rodolfo, Magali porque me han brindado su apoyo y por compartir conmigo buenos y malos momentos

A mi director de tesis Dr. José Villanueva, por su valiosa guía y asesoramiento a la realización de la misma.

A mis amigos Javier, Juliana, Patricia, Brenda y Jossy, por la gran calidad humana que me han demostrado con su amistad.

Sin ustedes a mi lado, no lo hubiera logrado... les agradezco porque estos momentos son los que nos hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean, los amo!

Hilda Grace Rozas Latorre

INDICE GENERAL

CAPITULO I: MARCO TEORICO.....	9
1.1 CARACTERISTICAS DE LA MICROALGA <i>Chlorella vulgaris</i>.....	9
1.2 TAXONOMIA DE <i>Chlorella vulgaris</i>.....	10
1.3 USOS POTENCIALES DE <i>Chlorella vulgaris</i>.....	10
1.4 PARAMETROS DEL CULTIVO DE <i>Chlorella vulgaris</i>.....	11
1.5POTENCIAL BIORREMEDIADOR DE <i>Chlorella vulgaris</i>.....	13
1.6 ARSENICO DISTRIBUCION MEDIO AMBIENTAL.....	13
1.6.1 Compuestos de arsénico.....	14
1.6.2 Características generales del arsénico, forma de ocurrencia en el agua	15
1.6.3 Problemática del arsénico como contaminante del agua.....	17
1.6.4 Fuentes de contaminación medio ambiental con arsénico.....	17
1.7 PARQUE INDUSTRIAL DE RIO SECO DE AREQUIPA.....	19
1.7.1 Límites del Área.....	20
1.8 TRATAMIENTO DE RESIDUOS INDUSTRIALES CONTAMINADOS CON METALES PESADOS.....	20
1.8.1 Tratamientos Físicos.....	21
1.8.2 Tratamientos Químicos.....	22
1.8.3 Tratamientos Biológicos.....	24
1.9 BIOACUMULACION Y BIOADSORCION.....	26
1.9.1 Tipos de biomasa empleados para la bioabsorción.....	27
1.9.2 Biosorbentes disponibles en el mercado y sus aplicaciones industriales	30
1.10 PRUEBA DE TOXICIDAD UNIVERSAL CON PULGAS DE AGUA	31
1.10.1 Principio de la prueba.....	31
1.10.2 Cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba.....	32
1.10.3 Limpieza y mantenimiento.....	33
1.10.4 Alimentación.....	34
CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS.....	35
2.1 LUGAR DE EJECUCION.....	35
2.2 MATERIALES.....	35
2.2.1 Equipos.....	35

2.2.2 Material de vidrio.....	36
2.2.3 Reactivos.....	36
2.3 METODOS.....	37
2.3.1 Aislamiento de <i>Chlorella vulgaris</i> de muestras de agua provenientes de efluentes de aguas residuales.....	37
2.3.2 Evaluación del crecimiento <i>Chlorella vulgaris</i> en diferentes concentraciones de Arsénico III.....	37
2.3.3 Diseño y Construcción del Sistema de Flujo por Gravedad.....	39
2.3.3.1 Evaluación de la capacidad de bioabsorción de arsénico mediante un Sistema de flujo por gravedad con <i>Chlorella vulgaris</i> , en efluentes industriales del PIRS (Parque Industrial de Río Seco	39
2.3.4 Determinación de la toxicidad de efluentes industriales del PIRS tratados con <i>Chlorella vulgaris</i> , en el cultivo de <i>Daphnia magna</i>	43
2.3.5 Análisis y procesamiento de datos.....	46
2.3.5.1 Evaluación del crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en diferentes concentración de Arsénico III.....	46
2.3.5.2 Evaluación de la capacidad de bioabsorción de Arsénico Mediante un sistema modificado de flujo por gravedad con <i>Chlorella Vulgaris</i> , en efluentes industriales del PIRS.....	46
2.3.5.3 Determinación de la toxicidad de efluentes industriales del PIRS tratados con <i>Chlorella vulgaris</i> , en el cultivo de <i>Daphnia</i> <i>Magna</i>	47
2.4. FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	48
CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION.....	49
3.1 AISLAMIENTO DE <i>Chlorella vulgaris</i> DE MUESTRAS DE AGUA PROVENIENTES DE EFLUENTES DE AGUAS RESIDUALE.....	49
3.2 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO <i>Chlorella vulgaris</i> EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE As III.....	50
3.3 DISEÑO Y CONSTRUCCION DEL SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD PARA <i>Chlorella vulgaris</i> A ESCALA DE LABORATORIO.	56

3.3.1 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIOABSORCIÓN DE ARSÉNICO EN UN SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD CON <i>Chlorella vulgaris</i>.....	57
3.4 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE EFLUENTES INDUSTRIALES DEL PIRS TRATADOS MEDIANTE EL SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD A LA VELOCIDAD DE FLUJO DE 20mL/min.....	66
CONCLUSIONES.....	71
RECOMENDACIONES.....	73
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	74



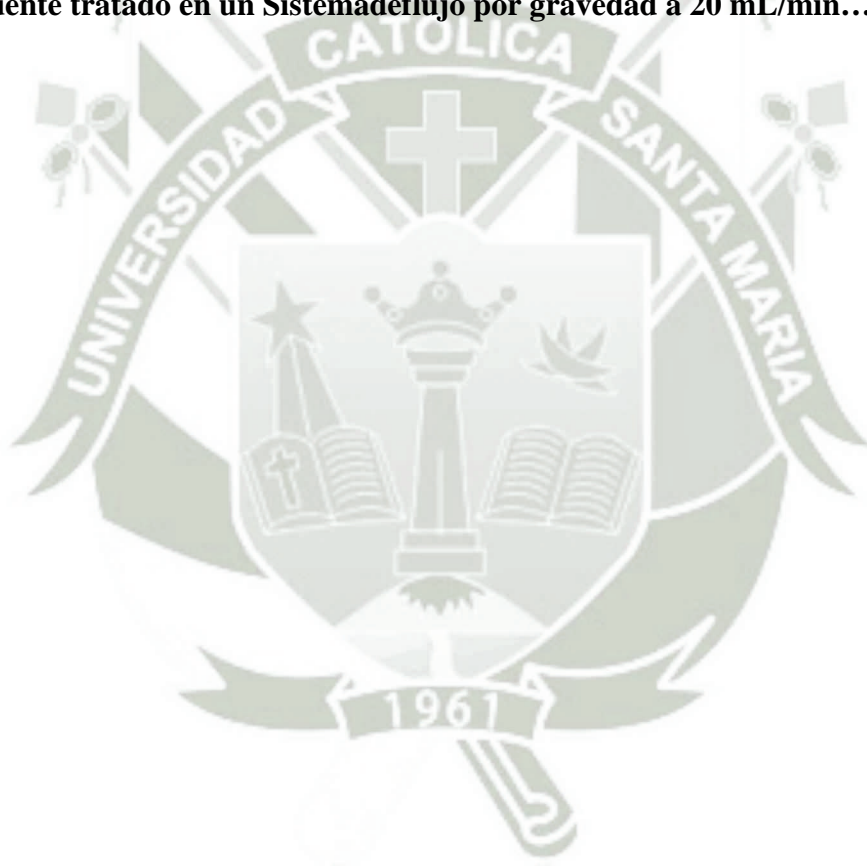
INDICE DE TABLAS

TABLA N° 1: EVALUACION Y COMPARACION DEL CRECIMIENTO <i>Chlorella vulgaris</i> EN DIFERENTES TIEMPOS DE EVALUACION Y CONCENTRACIONES DE ARSENICO III	51
TABLA N° 2: EVALUACION Y COMPARACION DEL PROMEDIO DE CRECIMIENTO <i>Chlorella vulgaris</i> EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ARSENICO III.....	53
TABLA N° 3: EVALUACION Y COMPARACION DE LA CONCENTRACION DE CLOROFILA A DE <i>Chlorella vulgaris</i> EMPACADA EN UN SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD PARA LA REMOCION DE ARSENICO EN EFLUENTES INDUSTRIALES DEL PIRS	58
TABLA N° 4: EVALUACION Y COMPARACION DE LA CONCENTRACION RESIDUAL DE ARSENICO DEEFLUENTES INDUSTRIALES DEL PIRS MEDIANTE UN SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD CON <i>Chlorella vulgaris</i>.....	62
TABLA N° 5: EVALUACION DE LA MORTALIDAD DE NEONATOS DE <i>Daphnia magna</i> “pulga de agua” A 48 hrs. DE SOMETIDOS A EFLUENTE TRATADO EN UN SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD A 20 mL/min.....	69

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> (100X).....	10
Figura N°2: Estructura de los compuestos de arsénico identificados en muestras medioambientales.....	16
Figura N°3: Vista general de <i>Daphnia magna</i>.....	32
Figura N°4: Cultivo de <i>Daphnia magna</i> y su ciclo de renovación.....	34
Figura N° 5: Diagrama de flujo por gravedad con cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>.....	40
Figura N° 6: Diagrama de flujo de las actividades vinculadas al desarrollo del ensayo de toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i>.....	45
Figura N° 7: Aislamiento de <i>Chlorella vulgaris</i>.....	49
Figura N° 8: Implementación del cultivo para la evaluación del crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> a diferentes concentraciones de As III...	50
Figura N° 9: Crecimiento <i>Chlorella vulgaris</i> según concentraciones de Arsénico III.....	52
Figura N° 10: prueba de comparación múltiple para la concentración de Clorofila A en un Sistema de flujo por gravedad con <i>Chlorella vulgaris</i>, en efluentes industriales del PIRS.....	54
Figura N° 11: Recuento de <i>Chlorella vulgaris</i> en cámara de Newbauer.....	56
Figura N° 12: Sistema de Flujo con medidas para su Construcción.....	57
Figura N° 13: Prueba de comparación múltiple para la concentración de Clorofila A en un sistema de flujo por gravedad con <i>Chlorella vulgaris</i>, en efluentes industriales del PIRS	59
Figura N° 14: Concentración de Clorofila A de <i>Chlorella vulgaris</i>.....	61
Figura N° 15: Prueba de comparación múltiple para la concentración residual de arsénico de efluentes industriales del PIRS mediante un Sistema de flujo por gravedad con <i>Chlorella vulgaris</i>.....	63
Figura N° 16: Remoción de Arsénico de efluentes industriales del PIRS mediante un sistema de flujo por gravedad con <i>Chlorella vulgaris</i>.....	64
Figura N°17: Sistema de flujo por gravedad a diferentes velocidades de flujo con cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>.....	66

Figura N° 18: Muestras empacadas en el sistema de flujo por gravedad.....	67
Figura N° 19: Implementación del cultivo de <i>Daphnia magna</i> “pulga de agua”, para la evaluación de la toxicidad de efluentes industriales del PIRStratados mediante el sistema de flujo por gravedad a la velocidad de Flujo de 20 mL/min.....	68
Figura N° 20: Neonatos de <i>Daphnia magna</i> “pulga de agua” a 48 hrs. de sometidos a efluente tratado en el sistema de flujo por gravedad a 20 mL/min.....	70
Figura N° 21: Determinación de la concentración letal media CL_{50} de neonatos de <i>Daphnia magna</i> “pulga de agua” a 48 hrs. de sometidos a efluente tratado en un Sistema de flujo por gravedad a 20 mL/min.....	71



RESUMEN

En la presente investigación se evaluó la remoción de Arsénico de efluentes del Parque Industrial de Río Seco (PIRS), mediante bioabsorción con *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio, para ello mediante diluciones sucesivas se obtuvo el cultivo puro de la microalga de efluentes de la planta de tratamiento de Chilpina, se evaluó la resistencia mediante el crecimiento de *Chlorella vulgaris*, en matraces de 250mL con la aplicación de 1.6, 3.2 y 6.4 mg/L de Arsénico III en forma de Na_2HAsO_3 .

La capacidad de bioabsorción de Arsénico de efluentes del PIRS, se evaluó mediante la concentración de Clorofila A y la concentración residual de Arsénico después de someter a los efluentes a las velocidades de flujo de 20, 40 y 80 mL/min en un sistema de flujo por gravedad, construido mediante contenedores interconectados empacados con 1.5L cultivo puro de *Chlorella vulgaris*.

La evaluación de la toxicidad se realizó para el efluente que presentó la menor concentración residual de Arsénico en el sistema de flujo por gravedad mediante un bioensayo, donde se evaluó la mortalidad de neonatos de *Daphnia magna* “pulga de

agua” así como la determinación de la concentración letal media CL_{50} . Los resultados demostraron una efectivaremoción de Arsénico por *Chlorella vulgaris*, evidenciada por un mayor crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de Arsénico III en comparación con el cultivo puro de *Chlorella vulgaris*. La capacidad de remoción de Arsénico en efluentes del PIRS, mediante el sistema de flujo por gravedad fue mayor a la velocidad de flujo de 20 mL/min con una remoción del 60.05%, mostrando una reducción leve de biomasa evidenciada por la disminución en la concentración de clorofila A, presentando un 50% de mortalidad de neonatos de *Daphnia magna* a 48 hrs. con 3.25mg/L, concentración menos tóxica en comparación a las reportadas por presentarse una transformación del Arsénico en formas orgánicas menos tóxicas.



Palabras clave: bioabsorción, bioensayos, efluentes, microalga.

ABSTRACT

In this study we evaluated the effluent arsenic removal Industrial Park Rio Seco (PIRS) by *Chlorella vulgaris* bioabsorption with laboratory scale, for it was obtained by successive dilutions of pure culture microalgae plant effluent Chilpina treatment, resistance was evaluated by the growth of *Chlorella vulgaris* in 250 mL flasks with the application of 1.6, 3.2 and 6.4 mg/L of arsenic III Na_2HAsO_3 shaped.

Bioabsorption ability of effluent arsenic PIRS, was evaluated by the concentration of chlorophyll a and through the residual concentration of arsenic after subjecting the effluent to flow rates 20, 40 and 80 mL/min in a gravity flow system, constructed by interconnected containers packed with 1.5 L pure culture of *Chlorella vulgaris*. Toxicity assessment was performed for the effluent had the lowest residual arsenic concentration in the system by gravity flow by bioassay where neonatal mortality assessed *Daphnia magna* " flea water " and the determination of the median lethal concentration LC_{50} . The results showed an effective removal of arsenic by *Chlorella vulgaris*, evidenced by increased growth in the presence of different concentrations of Arsenic III compared with pure culture of *Chlorella vulgaris*. The arsenic removal capacity of the PIRS effluents, by gravity flow system was greater than the flow rate of 20 mL/min with a 60.05% removal, showing a slight reduction of biomass evidenced by the decrease in concentration chlorophyll a, showing a 50% mortality of *Daphnia magna* neonates to 48 hrs. with 3.25 mg/L, less toxic concentration compared to those reported by a transformation of arsenic occur in less toxic organic forms.

Keywords: bioabsorption, bioassays, effluents, microalgae.

INTRODUCCION

Los metales pesados se encuentran entre los contaminantes más tóxicos. Algunos, como el mercurio (Hg), cadmio (Cd), arsénico (As)- metaloide, cromo (Cr), talio (Tl), plomo (Pb), níquel (Ni) y zinc (Zn), constituyen una preocupación para el bienestar de los ecosistemas acuáticos y terrestres, y representan un riesgo para la salud de las personas que consumen productos con altos índices de estos metales en su constitución (Gadd, 1993).

El Arsénico (As) es un elemento muy común en la atmósfera, en rocas y suelos, en la hidrósfera y la biósfera. Es movilizadado al medio ambiente a través de una combinación de procesos que incluyen tanto procesos naturales (meteorización, actividad biológica, emisiones volcánicas), así como procesos antropogénicos (actividad minera, uso de combustibles fósiles, pesticidas, herbicidas, desecantes, conservadores de la madera, y como aditivos de piensos) (World Health Organization, 1993).

El Arsénico es un elemento extremadamente tóxico para el organismo humano, y no solo en concentraciones altas, donde la exposición causa efectos agudos que pueden llegar a ser letales, también la exposición durante un largo período a bajas concentraciones relativas de este metal, como por ejemplo, por ingestión de agua, se producen efectos negativos crónicos para la salud. Por eso, el Arsénico en las aguas superficiales (ríos, lagos, embalses) y subterráneas (acuíferos) susceptibles de ser utilizadas para consumo o regadío, constituye una gran amenaza para la salud. Ello es así, que ha llevado a organismos como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Unión Europea (Directiva 98/83) o la Agencia de Protección Ambiental estadounidense (USEPA) a establecer la reducción del límite del contenido de Arsénico en agua de consumo de 50 a 10 $\mu\text{g/L}$ (World Health Organization, 1993).

En la actualidad se presentan alternativas como los bioprocesos, que involucran distintas interacciones entre microorganismos y metales ecotóxicos, realizando transformaciones que permiten la extracción o estabilización de los metales, la implementación de sistemas eficientes de remoción de metaloides como el arsénico mediante el cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris*, permitirán reemplazar

algunos métodos convencionales de purificación de aguas que representen complejidad en su implementación y monitoreo, así como su elevado costo de operación. El uso de microalgas en biorremediación, presenta ciertas ventajas frente a otras alternativas tradicionales; resultando ser mucho más selectivas, de mayor eficacia para grandes volúmenes, generando pocos o ningún subproducto contaminante en su proceso, resultando un mínimo impacto ambiental (Madigan, M., 2002).

En Arequipa las diversas industrias ubicadas en el PIRS (Parque Industrial de Río Seco) generan residuos líquidos y sólidos, que son vertidos al medio ambiente con tratamientos deficientes y mayormente sin ningún tratamiento, originando un gran impacto por contaminación en el agua, suelo y aire, entre los principales contaminantes se encuentran metales ecotóxicos como el Cr, As, Cd, Pb, que repercuten gravemente en la salud humana y en los cultivos de zonas aledañas, cuyos productos cosechados están contaminados con concentraciones elevadas de metaloides ecotóxicos como el Arsénico (World Health Organization, 1993).

El principal objetivo en este trabajo es evaluar la remoción de Arsénico de efluentes del PIRS, mediante bioabsorción con *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio.

HIPOTESIS

Dado que la microalga *Chlorella vulgaris* presenta alta tolerancia de supervivencia en ambientes extremos, en presencia de metales ecotóxicos, es probable que presente alta capacidad de remoción de Arsénico en efluentes industriales.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la remoción de Arsénico de efluentes del Parque Industrial de Río Seco (PIRS), mediante bioabsorción con *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar e identificar *Chlorella vulgaris* de muestras de agua provenientes de efluentes de aguas residuales.
- Observar la cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en distintas concentraciones de Arsénico III
- Diseñar y construir un sistema de flujo por gravedad para *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio.
- Evaluar la capacidad de bioabsorción de Arsénico mediante un sistema de flujo por gravedad con *Chlorella vulgaris*, en efluentes industriales del PIRS (Parque Industrial de Río Seco).
- Determinar la toxicidad de efluentes industriales del PIRS tratados con *Chlorella vulgaris*, mediante el bioanálisis con *Daphnia magna*.

VARIABLES E INDICADORES

La siguiente tabla muestra las variables e indicadores que se evaluaron en la presente investigación:

Descripción de Variables Independientes y Dependientes

<i>Variables independientes</i>	<i>Indicadores</i>
-Concentración de Arsénico	Concentración Arsénico III a partir de Na_2HAsO_3 , (mg/L)
-Velocidad de flujo	Velocidad de paso del efluente del PIRS (mL/min)
-Concentración de efluente tratado	Diluciones del efluente tratado, (mL agua reconstituida/mL del efluente tratado)
<i>Variables dependientes</i>	<i>Indicadores</i>
-Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i>	Número de células de <i>Chlorella vulgaris</i> / <i>Ml</i>
	Concentración de Clorofila A (mg/L)
-Bioabsorción de Arsénico	Concentración residual de Arsénico (ppm)
-Toxicidad del efluente tratado	Determinación de la CL_{50} a los 48 hrs.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1 CARACTERISTICAS DE LA MICROALGA *Chlorella vulgaris*

Chlorella apareció en la Tierra hace aproximadamente 1.5 o 2 mil millones de años. Es un alga verde unicelular de agua dulce; forma esférica, cerca de 2-10 micras de diámetro que es extensamente encontrada en lagos y pantanos por todo el mundo. El nombre *Chlorella* proviene del griego *Chloros*, que significa verde, y del latín *ella*, que significa cosa pequeña, con un diámetro que es entre 100 y 1.000 veces menor a 1 mm (Figura N°1). El color verde lo obtiene de los cloroplastos, que son las estructuras encargadas de realizar la fotosíntesis. Gracias a la fotosíntesis, que es el proceso por el que adquiere carbono de la atmósfera (como elemento vital para su crecimiento y desarrollo) forma parte de la base de la cadena alimenticia (Madigan, M., 2002).

Se reproduce muy rápidamente y de forma asexual. Para eso precisa el carbono que obtiene de la fotosíntesis, agua, luz y pequeñas cantidades de minerales. Debido a su rápido crecimiento, se estudia la posibilidad de que sea utilizada para producir biodiésel. Contiene grandes cantidades de proteínas, vitamina C, betacaroteno y vitaminas B (B1, B2, B6 y B12). Es utilizada para fabricar suplementos alimenticios, productos cosméticos contra el envejecimiento, para estimular el sistema inmune y para la desintoxicación de metales pesados (Madigan, M., 2002).

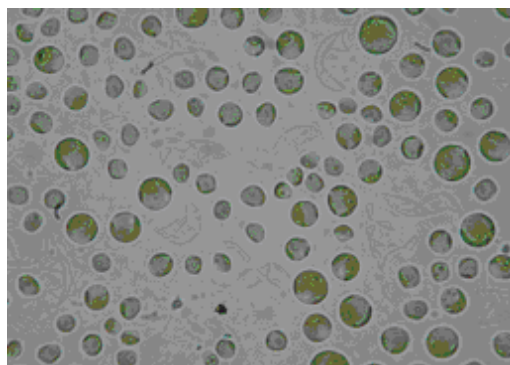


Figura N° 1.

Cultivo de *Chlorella vulgaris* (100X).

Fuente: Obtención de protocolos para el aislamiento, cultivo y extracción de ADN de *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Montes J., 2012).

1.2 TAXONOMIA DE *Chlorella vulgaris*.

La microalga *Chlorella vulgaris* taxonómicamente (M.W. Beyerinck, 1890) se encuentra clasificada de la siguiente manera:

Reino: Protista

División: Chlorophyta

Clase: Chlorophyceae

Orden: Chlorococcales

Familia: Oocystaceae

Género: *Chlorella*

Especie: *Chlorella vulgaris*

1.3 USOS POTENCIALES DE *Chlorella vulgaris*.

Comparada con otras plantas, la microalga *Chlorella* tiene una alta concentración de clorofila, así que su capacidad de fotosíntesis es muchas veces mayor que la de otras plantas. *Chlorella vulgaris* puede dividirse en cuatro células cada 20 hrs. (Kanno y Kazie, 2005).

En el curso del tiempo, el uso continuo del alga bajo condiciones controladas ha sido importante, con diversas posibilidades económicas. La investigación con la microalga ha demostrado que la biomasa puede ser usada para aplicaciones, como son: alimento para animales, biofertilizantes, condicionador del suelo, alimento de los acuarios o puede ayudar a resolver problemas de salud pública, por medio de la purificación biológica de las aguas negras de las ciudades (Kanno y Kazie, 2005).

Chlorella está siendo investigada como un nuevo recurso alimenticio (ya que una célula de esta contiene cerca de 50% de proteínas, 5% de clorofila y un gran número de vitaminas y carotenos) para utilizarse en las poblaciones humanas pobres de todo el mundo y para proveer comida y oxígeno en viajes al espacio y en submarinos (Lee, 1995). Según se ha documentado, posee beneficios terapéuticos, como la capacidad de desintoxicar al organismo de metales pesados como el Hg, el Cd y el Pb entre otros químicos, que son contaminantes agregados a insecticidas o plásticos. Además se piensa que posee la capacidad de prevenir el cáncer (Konishi *et al.*, 1996).

Las investigaciones sobre el cultivo de microalgas revisten gran importancia dada su amplia aplicación biotecnológica y comercial. En tal sentido, se han utilizado los cultivos discontinuos por su relativo fácil manejo, para determinar la cinética de crecimiento y los parámetros que influyen en el desarrollo poblacional de las microalgas (Abalde *et al.* 1995).

Sin embargo, el uso de los medios de cultivo sintéticos ha incrementado sustancialmente el valor económico para la producción de la biomasa de estos microorganismos (González *et al.* , 1999).

1.4 PARAMETROS DEL CULTIVO DE *Chlorella vulgaris*.

Un cultivo tiene tres diferentes componentes: un medio de cultivo contenido en un recipiente adecuado; las algas creciendo en el medio y aire, para permitir el intercambio de dióxido de carbono entre el medio y la atmósfera.

Los parámetros más importantes que regulan el crecimiento de las algas son principalmente la luz, el pH, la turbulencia, la salinidad y la temperatura, entre otros. (Barsanti *et al.*, 2006).

- **Temperatura**

La mayoría de la especies de microalgas toleran temperaturas entre 16 y 27°C, aunque esto puede variar de acuerdo a la composición del medio de cultivo o la especie cultivada. Un valor intermedio de 18-20°C es frecuentemente empleado. Temperaturas por debajo de los 16°C pueden retardar el crecimiento, mientras que aquellas por arriba de los 35°C son letales para cierto número de especies (Barsanti *et al.*, 2006).

- **Luz**

Como en las plantas, la luz es la fuente de energía que promueve las reacciones fotosintéticas en las algas. Aquí, la intensidad, la calidad espectral y el fotoperiodo deben ser considerados (Barsanti *et al.*, 2006).

- **pH**

El rango del pH para la mayoría de las especies de algas cultivadas es entre 7 y 9, siendo el rango óptimo 8.2-8.7. Para mantener un valor aceptable es necesario airear el medio de cultivo (Barsanti *et al.*, 2006).

- **Aireación**

La aireación es necesaria para prevenir la sedimentación de las algas, para asegurar que todas las células de la población están igualmente expuestas a la luz y los nutrientes, y para mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire (Barsanti *et al.*, 2006).

1.5 POTENCIAL BIORREMEDIADOR DE *Chlorella vulgaris*.

El género *Chlorella* es un alga verde que, debido a su capacidad de fotosintetizar (le permite carecer de un aporte exógeno de materia orgánica) y a su situación en las cadenas tróficas como productor primario, le convierte en un organismo ideal para experimentar su capacidad de acumular metales. Se trata de un alga esférica, unicelular, eucariota y que presenta clorofila a y b. Vive en medios marinos, en el agua dulce e incluso en suelos encharcados. Además es frecuente que aparezca en simbiosis con esponjas, hydra y paramecio. Se ha demostrado que es capaz de absorber grandes cantidades de metales, principalmente Cr^{4+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} . El proceso que realiza para incorporar los metales a sus células consiste, a grandes rasgos, en dos etapas. La primera de ellas, denominada biosorción, transcurre en muy poco tiempo y es similar tanto en la pared celular como en toda la célula, es decir que ambas estructuras introducen, en un tiempo similar, cadmio, plomo y cobre, mediante un intercambio de iones en el que el Na, Mg y Ca resultan desplazados a favor de los metales pesados. A continuación el metal puede unirse a distintos grupos funcionales como aminas, alcoholes, fosfatos, hidroxilos. Uno de los factores que contribuyen a la eficacia de este sistema es la composición de la pared celular, que posee una mezcla compleja de azúcares, glucosamina, proteínas y ácido urónico. La segunda fase, llamada bioacumulación requiere un período de tiempo mayor y a diferencia de la primera etapa, se trata de un proceso activo en el que se piensa que interviene el metabolismo de la célula (Aksu, Z. 2005).

1.6 ARSENICO DISTRIBUCION MEDIO AMBIENTAL

El Arsénico está ampliamente distribuido en gran número de minerales. Las mayores concentraciones, en general, se dan en forma de arseniuros de cobre, plomo, plata y oro o como impurezas en sulfuros. Los principales minerales que contienen Arsénico son arsenopirita (FeAsS), rejalgar (As_4S_4) y oropimente (As_2S_3) (World Health Organization, 1993).

El contenido de Arsénico de la corteza terrestre está entre 1.5 y 2 mg/Kg, siendo el elemento número veinte en la lista de los elementos más abundantes (N.A.S., 1977). Aunque el As es estable en condiciones reductoras (forma trivalente), no es frecuente encontrarlo en su estado fundamental. La forma oxidada, arseniato, aunque es la más abundante en la naturaleza (se encuentra normalmente en depósitos sedimentarios), está fuertemente enlazada a los minerales del suelo, particularmente a los óxidos e hidróxidos metálicos coloidales, mediante enlaces iónicos (Wauchope, 1983).

1.6.1 Compuestos de Arsénico.

Los principales compuestos derivados del arsénico, son tanto orgánicos como inorgánicos.

- **Compuestos inorgánicos:** El Arsénico pertenece al grupo V a, y las principales valencias que el elemento presenta en la naturaleza son 3^- , 3^+ y 5^+ . El principal compuesto comercial es el óxido de Arsénico III, As_2O_3 , que a temperaturas superiores a $1073^\circ C$ pasa a ser un dímero gaseoso de fórmula molecular As_4O_6 . Este compuesto se obtiene como un subproducto en la extracción del cobre, zinc y plomo. El Arsénico normalmente está presente como arseniuros metálicos o como sulfuros de arsénico, que durante los diversos tratamientos a los que se somete al cobre para su extracción y transformación se volatilizan y por condensación de estos gases se obtiene el óxido, este compuesto presenta un punto de ebullición relativamente bajo, $465^\circ C$, aunque puede sublimar a temperaturas inferiores a ésta. Su solubilidad en agua es baja, un 2% a $25^\circ C$, sin embargo, ésta se eleva cuando se emplea como disolvente una disolución acuosa del ácido clorhídrico o una disolución de carácter básico, por ello sus soluciones comerciales son ligeramente ácidas y contienen ácido arsenioso (H_3AsO_3). El ácido arsénico (forma pentavalente) y el arsenioso (forma trivalente) son especies termodinámicamente estables bajo condiciones oxidantes y reductoras, respectivamente. Sin embargo, el predominio de una de las

formas no implica por supuesto la no existencia de la otra. El arseniato de plomo, el arseniato cúprico, el acetoarseniato de cobre (II) o verde de París, y el arseniato de calcio, compuestos que se utilizan como insecticidas, presentan una baja solubilidad en agua. Los haluros de arsénico y la arsina no son compuestos que se encuentren libres en el medio ambiente, aunque son especies de suma importancia en el análisis químico (Wauchope, 1983).

- **Compuestos orgánicos:** El Arsénico está presente en numerosos compuestos de carácter orgánico, debido a la elevada estabilidad del enlace carbono-arsénico bajo las condiciones medioambientales normales (pH y potencial redox). Como consecuencia de la actividad biológica, se producen diversos compuestos de Arsénico metilados como son la di y trimetilarsina. Estas especies tras una oxidación se transforman en los ácidos metilarsonico y dimetilarsonico, compuestos que forman sales solubles con los metales alcalinos. Mediante una reducción estos ácidos pueden volver a su forma primitiva de arsinas. Cabe mencionar que en los últimos años se han encontrado en organismos marinos compuestos tales como la arsenobetaína y la arsenocolina (World Health Organization, 1993).

1.6.2 Características generales del Arsénico, forma de ocurrencia en el agua.

El Arsénico se halla en las aguas naturales como especie disuelta, la cual se presenta por lo común como oxianiones con arsénico en dos estados de oxidación, arsénico trivalente (As III) y arsénico pentavalente (As V), y con menos frecuencia como As 0, As -I y As -II. El Arsénico V aparece como H_3AsO_4 y sus correspondientes productos de disociación (H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} y AsO_4^{3-}). El Arsénico III aparece como H_3AsO_3 y sus correspondientes productos de disociación (H_4AsO_3^+ , H_2AsO_3^- , HAsO_3^{2-} y AsO_3^{3-}). Aunque

tanto el Arsénico V como el Arsénico III son móviles en el medio, es precisamente el Arsénico III el estado más lábil y biotóxico (Lillo, 2003).

El Arsénico se encuentra fundamentalmente como H_2AsO_4^- a valores de pH bajos (inferiores a 6.9), mientras que a pH más alto, la especie dominante es HAsO_4^{2-} . En condiciones de extrema acidez, la especie dominante será H_3AsO_4 , mientras que en condiciones de extrema basicidad, la especie dominante será AsO_4^{3-} . En condiciones reductoras a pH inferior a 9.2, predominará la especie neutra (Lillo, 2003).

Las formas orgánicas de Arsénico suelen aparecer en concentraciones menores que las especies inorgánicas, aunque pueden incrementar su proporción como resultado de reacciones de metilación catalizadas por actividad microbiana (bacterias, algas). Las formas orgánicas dominantes son el ácido dimetilarsínico {DMAA, $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$ } y el ácido monometilarsínico {MMAA, $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$ }, donde el arsénico está presente en ambos casos como Arsénico V en la Figura N°2 se pueden observar algunas especies de arsénico que se encuentran en bacterias y algas (Torralba, 1996).

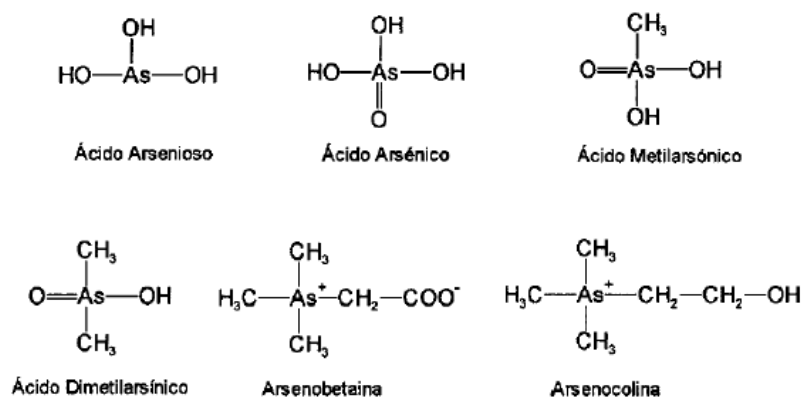


Figura N°2.

Estructura de los compuestos de Arsénico identificados
en muestras medioambientales.

Fuente: Mejoras al sistema de Generación de Hidruros-Absorción Atómica para la Determinación de Arsénico Total en Materiales Biológicos(Torralba, 1996).

1.6.3 Problemática del Arsénico como contaminante del agua

El Arsénico se encuentra naturalmente en el suelo y en algunos minerales, como la pirita o arsenopirita. Puede incorporarse al aire, al agua y a los suelos de otras áreas, como polvo que levanta el viento o como efluente de lluvia o filtraciones de agua a través del suelo (Junta de Castilla y León, 2005).

Se han citado contenidos altos de arsénico en aguas naturales en diversos ambientes, aunque se encuentran las mayores concentraciones en las aguas subterráneas. Las concentraciones altas en los acuíferos no se restringen a determinadas condiciones o ámbitos, apareciendo en condiciones oxidantes, reductoras y de pH alto, con circulación geotermal, afectados por procesos ligados a la actividad minera o relacionados con depósitos minerales, y ligados a otros procesos antropogénicos (actividad industrial, asentamientos urbanos, actividad agropecuaria y otros). Sin embargo, la mayor parte de estos con contenidos altos de arsénico tienen un origen ligado a procesos geoquímicos naturales (Lillo, 2003).

1.6.4 Fuentes de contaminación medio ambiental con Arsénico.

Existen tres fuentes principales de contaminación de Arsénico en el medio ambiente; fundición de metales, quemado de carbón y el uso de pesticidas que en su composición contengan Arsénico (Lepp, 1981).

- **Extracción y fundición de minerales:** La existencia de Arsénico en minerales de zinc-plomo, de cobre y su presencia en muchas piritas son causa de contaminación por arsénico en el entorno de los sitios de fundición y tratamiento de los minerales, debido a la volatilización de algunos compuestos durante el proceso de fundición (Crecelius et al., 1974; Ragaini et al., 1977).

La mayoría de estas emisiones gaseosas se dan en forma de trióxido, el cual forma ácido arsenioso al disolverse en agua. Los minerales auríferos también contienen altas concentraciones de este,

principalmente como arsenopirita, desembocando en problemas de polución cerca de las minas de oro (O'Toole et al., 1971; Rosehart y Lee, 1973; Jervis y Tiefenbach, 1979). El polvo y los gases emanados desde las operaciones de fundición han contaminado suelos y plantas, variando los grados según la distancia desde la zona de muestreo al lugar de polución, existencia de invernaderos en altura, etc. En la actualidad y a lo largo de todo el mundo, se encuentran depósitos de desechos mineros y escorias de fundiciones que contienen grandes cantidades de arsénico y metales pesados asociados (Tiefenbach, 1979).

- **Quemado de carbón:** El Arsénico aparece ampliamente en el carbón como arsenopirita (Swaine, 1977) y se da como trióxido en las emisiones desde las plantas carboníferas (Bencko y Symon, 1977). Las partículas de polvo aerotransportadas pueden contener más de 1700 ppm de arsénico; habiéndose hallado elevados niveles de este elemento contaminante en suelos recogidos alrededor de una estación generadora (Temple et al., 1977).
- **Pesticidas, herbicidas, insecticidas y plaguicidas:** Desde el siglo diecinueve hasta la mitad del siglo veinte los arsenicales inorgánicos fueron usados como pesticidas generales en huertos y cultivos de patatas. El arseniato de plomo fue usado para el control de insectos en huertos y como pesticida en la lucha contra el agusanado de manzanas y peras (*Laspeyresia pomonella*) y en la actualidad sigue empleándose por coadyuvar a la acción de los modernos fungicidas (endureciendo la piel, no perjudicando a los depredadores de la araña roja, pulgones y otras plagas). El arseniato de calcio fue utilizado como insecticida en algodón y tabaco, siendo empleado también en espolvoreo contra el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*), cuca de la alfalfa (*Colaspidema*), aunque su empleo ha decrecido considerablemente. El verde de París (acetoarsenito de cobre), arseniato de magnesio,

arseniato de cinc, arsenito de cinc y muchos otros han sido usados a través de los tiempos como insecticidas específicos. El arsenito sódico ha sido ampliamente usado como herbicida y esterilizante no selectivo del suelo, además se utiliza en el viñedo para la lucha contra yesca o apoplejía parasitaria (*Stereum hirsutum*), excoriosis (*Phomopsis viticola*), piral (*Sparganothis pilleriana*). El ácido arsénico ha sido usado extensivamente como desecante de algodón (Levander, 1977). Más recientemente los arsenicales orgánicos, metanoarsoniato monosódico (MSMA), metanoarsoniato disódico (DSMA), y ácido cacodílico (CA) óxido de hidroxidimetilarsina) se han introducido como herbicidas, silvicidas y desecantes (Levander, 1977)

- **Otras fuentes:** El Arsénico no ha sido un elemento de mucho interés en los estudios realizados sobre lodos de depuradoras y aguas residuales y ha sido generalmente olvidado por los servicios analíticos. Sin embargo, Haan (1978) dio valores entre 5.8 y 45.9 ppm en lodos de Holanda; Furr et al. (1976) dieron valores de 3 a 30 ppm en lodos de U.S.A. y Temple et al. (1977) encontraron valores de 4.2 a 19.8 ppm en lodos de Canadá.

1.7 PARQUE INDUSTRIAL DE RIO SECO DE AREQUIPA.

El Parque Industrial Río Seco se localiza al Noreste del centro de la Ciudad de Arequipa; políticamente pertenece a la jurisdicción del distrito de Cerro Colorado, provincia y departamento de Arequipa. La primera etapa del Parque Industrial se encuentra entre las coordenadas geográficas 16° 20,955' y 16° 21,372' de latitud sur y entre los 71° 35,288' y 71° 35,977' de longitud oeste. La segunda etapa del Parque Industrial se encuentra ubicado entre los 16° 21,372' y 16° 21,742' de latitud sur y, entre los 71° 35,977' y 71° 36,265' de longitud oeste. El Parque Industrial Río Seco está ubicado geográficamente entre la costa y la meseta de la sierra baja del Perú, en

la margen derecha del Río Chili. Tiene una altitud promedio de 2 250 msnm. Su relieve presenta elevaciones, declives y pendientes no pronunciadas (CONAM, 2012).

1.7.1 Límites del Área

La primera etapa del Parque Industrial limita por el norte con el parque artesanal industrial y de servicio “La Alborada”; por el oeste con el talud de margen izquierdo de la quebrada de Añashuayco; por el este con los terrenos de la Asociación mutualista de pequeños agricultores de Cayma y por el sur con la segunda etapa del Parque Industrial donde se encuentra actualmente una laguna de estabilización no concluida, terrenos vírgenes y la presencia de invasores. Al sureste del Parque Industrial se encuentra un área destinada a los labradores de sillar denominado “Las Cantarillas” (CONAM, 2012).

1.8 TRATAMIENTO DE RESIDUOS INDUSTRIALES CONTAMINADOS CON METALES PESADOS.

Existe un gran número de tratamientos a los que se pueden someter los residuos tóxicos y peligrosos, cuya finalidad se dirige básicamente a la recuperación de recursos (materiales y energéticos), la detoxificación, y la reducción de volumen previa a su disposición final (Twidwell, L. et al, 1999).

Los metales pesados no pueden ser degradados, sino sólo movilizados o inmovilizados para extraerlos desde matrices sólidas o de soluciones, respectivamente, a fin de disponer de ellos de modo seguro. En bibliografía se encuentran descritas una gran cantidad de técnicas, incluyendo tratamientos físicos, químicos y biológicos para tratar la contaminación con metales pesados. Entre los que se pueden mencionar.

1.8.1 Tratamientos Físicos:

- **Lavado:** Implica la adición de una solución a los sedimentos contaminados para que ocurra la transferencia de los contaminantes desde los sedimentos a la solución de lavado. Es más apropiado para los metales ligados débilmente en forma de hidróxidos, óxidos y carbonatos (Eccles H.,1999).
- **Precipitación:** El método tradicional de eliminación de metales pesados a partir de soluciones, es la alcalinización del efluente (comúnmente con carbonato o soda cáustica). El aumento de pH provoca la precipitación de los metales pesados como hidróxidos. Estos últimos suelen ser precipitados coloidales, por lo que ocupan gran volumen y coprecipitan con otros elementos (Jong, T., 2003). Por ejemplo, se estima que la precipitación como hidróxido de 100 mg.L^{-1} de Cu II, Cd II, Hg II producen alrededor de 1000, 900 y 500 mg.L^{-1} de desechos sólidos, respectivamente. La generación de grandes volúmenes de hidróxidos es claramente un inconveniente en este proceso. También se pueden mencionar otras limitaciones como, por ejemplo, la baja eficiencia al tratar efluentes diluidos, la presencia de elementos anfóteros o complejantes en la solución, la necesidad de trabajar con pH muy altos y la baja selectividad (Eccles H.,1999).
- **Solidificación/estabilización:** el propósito de esta técnica es reducir la movilidad de los metales pesados mediante la adición de un agente que solidifica y luego inmoviliza los metales. La solidificación se refiere al proceso que encapsula los materiales de desecho en un sólido monolítico de alta integridad estructural (Eccles H.,1999).
- **Electrocinética:** los procesos electrocinéticos implican pasar una corriente eléctrica de baja intensidad entre un cátodo y un ánodo incrustados en los sedimentos contaminados. Iones y pequeñas

partículas cargadas, además de agua, son transportados entre los electrodos. El gradiente eléctrico inicia una serie de procesos: el movimiento por electromigración (movimiento de cargas químicas), electro-ósmosis (movimiento de fluidos), electroforesis (movimiento de partículas cargadas) y electrólisis (reacciones químicas debido al campo eléctrico). Los metales pueden ser removidos por electrodeposición o precipitación/coprecipitación en los electrodos, mediante resinas de intercambio iónico o ser recuperados mediante el bombeo de los residuos a la superficie. Otros componentes no iónicos también puede ser transportados por la corriente (Eccles H., 1999).

- **Encapsulación:** es una alternativa de recuperación que comprende el aislamiento físico y la contención del material contaminado. En esta técnica, los suelos afectados se encuentran aislados por capas de baja permeabilidad. Estas capas, de tejidos sintéticos o arcillas, son diseñadas para limitar la infiltración de la precipitación y por lo tanto evitar la lixiviación y la migración de contaminantes fuera del sitio y en las aguas subterráneas (Jong, T., 2003).
- **Separación mecánica:** el objetivo de los procesos de selección de tamaño es quitar las partículas más grandes y más limpias, de las más pequeñas y más contaminadas. La caracterización en términos de tamaño de partículas y nivel de contaminantes en cada fracción es el parámetro más importante para determinar la idoneidad de este proceso (Dermont G., et al, 2008).

1.8.2 Tratamientos Químicos:

- **Separación pirometalúrgica:** los procesos pirometalúrgicos emplean altas temperaturas (200-700°C) para volatilizar metales en suelos contaminados. Luego de la volatilización, los metales son recuperados e inmovilizados. Este método es aplicado a mercurio. Otros metales como

arsénico, plomo, cadmio y cromo pueden requerir pretratamientos con agentes reductores o fundentes para ayudar a la fusión (Dermont G., et al, 2008).

- **Vitrificación:** implica la inserción de electrodos en el suelo que debe ser capaz de transportar la corriente para fundir silicatos y luego solidificar al enfriarse. Las temperaturas pueden llegar a 3000°C, por lo que durante el proceso pueden generarse gases tóxicos. Los costos de esta operación pueden ser altos. Un alto contenido orgánico también puede disminuir la eficiencia. Es aplicable para una amplia variedad de metales (Khan FI., et al, 2004).
- **Intercambio iónico:** para el desarrollo de esta técnica se emplean resinas de intercambio iónico compuestas de una alta concentración de grupos polares, ácidos o básicos, incorporados a una matriz de un polímero sintético (resinas estirénicas, resinas acrílicas, etc.) y actúan tomando iones de las soluciones (generalmente acuosas) y cediendo cantidades equivalentes de otros iones. La principal ventaja de las resinas es que pueden recuperar su capacidad de intercambio original, mediante el tratamiento con una solución regenerante (Khan FI., et al, 2004).
- **Oxidación/reducción química:** la oxidación/reducción de metales pesados es otro método para remediar los sedimentos *ex situ*. Una tecnología llamada desintoxicación TR-DETOX involucra la filtración de los reactivos orgánicos e inorgánicos de metales pesados para reducir a su más bajo estado de valencia y de forma estable complejos organometálicos. Uno de los principales productos químicos es el politiocarbonato de sodio que forma un precipitado que se hace menos soluble en el tiempo. El residuo tratado ya no es lixiviable. No es necesario el agregado de cal, silicatos y cemento *Portland* y los costos son, por lo general, alrededor de una cuarta parte de los procesos de

estabilización/solidificación. Se requieren pruebas piloto para determinar la formulación más adecuada (Mulligan CN., et al, 2001).

1.8.3 Tratamientos Biológicos:

Las técnicas mencionadas anteriormente presentan problemas técnicos y económicos. Debido a ello, en la actualidad han aparecido otras alternativas como los bioprocesos, que involucran distintas interacciones entre los microorganismos y los metales realizando transformaciones que permiten la extracción o estabilización de los metales. Todas las interacciones entre los microorganismos y los metales u otros elementos como carbono, nitrógeno, azufre y fósforo son componentes fundamentales de los ciclos biogeoquímicos. Las interacciones metal-microbiota son estudiadas entonces en profundidad en el contexto de la biotecnología ambiental, con el objeto de implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales pesados y radionúclidos. Los procesos biológicos presentan ciertas ventajas frente a otras alternativas tradicionales; ya que son mucho más selectivos, económicos, menos contaminantes y de mayor eficacia para grandes volúmenes y pequeñas concentraciones (Vijayaraghavan K, 2008).

Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes a metales. La resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes procesos. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal. En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. Tanto los microorganismos resistentes como tolerantes son de particular interés como captores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes (Vijayaraghavan K, 2008).

Los procesos de biorremediación de contaminaciones con metales pesados pueden dividirse en dos grupos: de movilización (lixiviación, quelación, y metilación) e inmovilización (sorción, precipitación y fitorremediación) (Vijayaraghavan K, 2008).

A continuación se describirán las características más importantes de cada uno de ellos:

- **Biolixiviación:** está basada en la habilidad de ciertos microorganismos para solubilizar metales pesados presentes en matrices insolubles transformándolos en formas solubles que son extraídas fácilmente del medio en que se encuentran y posibilitando su recuperación posterior. Esta capacidad implica principalmente la formación de ácidos orgánicos e inorgánicos (Eccles H.,1999).
- **Quelación:** emplea agentes generados por microorganismos que tienen la capacidad de formar complejos estables con metales. Su uso ofrece un enfoque prometedor para la extracción de los metales de los suelos contaminados. Hay cinco factores principales en la selección de agentes quelantes para la extracción de metales de los suelos: (1) Los agentes quelantes deben ser capaces de formar complejos muy estables en un amplio rango de pH, (2) los complejos metálicos que se forman no se deben adsorber en la superficie del suelo, (3) los agentes quelantes deben tener una baja biodegradabilidad si los reactivos deben ser reciclados para su reutilización en el proceso, (4) los reactivos utilizados deben ser rentables; (5) la recuperación del metal debe ser rentable (Vijayaraghavan K, 2008).
- **Metilación:** la metilación de mercurio, arsénico, selenio, estaño, telurio y plomo puede estar mediada por una serie de bacterias y hongos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Grupos metilo se transfieren enzimáticamente al metal, y una especie determinada puede transformar un número de metales diferentes (Twidwell, L. et al, 1999).
- **Bioabsorción:** es la remoción de metales pesados contenidos en soluciones acuosas mediante la unión a biomasa. Se conoce una variedad de biomateriales que pueden unirse a estos contaminantes,

como bacterias, hongos, algas y residuos industriales y agrícolas (Vijayaraghavan K, 2008).

- **Bioprecipitación:** se utilizan microorganismos capaces de generar metabolitos que precipitan con muchos de los metales pesados. Un grupo importante de estos microorganismos son las bacterias sulfato-reductoras. Estas bacterias anaeróbicas son capaces de formar sulfuros a partir de la reducción de sulfatos, lo que permite, debido a la habitual baja solubilidad de los primeros, separarlos del medio líquido (Vijayaraghavan K, 2008).
- **Fitorremediación:** es el empleo de plantas para remover contaminantes del ambiente. Existen distintos tipos que involucran procesos de estabilización, extracción, volatilización, degradación e inmovilización. Es un método apropiado para descontaminar superficies extensas, no introduce alteraciones en el medio, la generación de productos secundarios es mínima y el suelo puede ser reutilizado. Pero debe tenerse en cuenta que no puede ser empleado a grandes profundidades, los tiempos del proceso pueden ser prolongados y la biodisponibilidad de los metales es un factor limitante para la captación (Eccles H.,1999).

1.9BIOACUMULACION Y BIOADSORCION.

Los microorganismos asimilan y concentran nutrientes catiónicos presentes en medios acuosos y emplean estos mismos mecanismos para la concentración de metales y radionucleidos. El proceso de bioacumulación tiene lugar cuando la energía metabólica se emplea para la asimilación de los componentes inorgánicos, y cuando no requiere esta energía se refiere al proceso conocido como bioadsorción, que generalmente requiere de la complejación de los elementos inorgánicos, por ligandos o grupos funcionales, de la pared exterior de la célula. Cuando por el contrario, los microorganismos retienen internamente estos metales es por

complejación con diversos ligandos citoplasmáticos como los polifosfatos o las proteínas. Las posibilidades de este tipo de procesos sobre un gran número de cationes y radionucleidos utilizando bacterias, hongos y algas se han puesto de manifiesto frecuentemente (Volesky, B., 1990).

Los microorganismos también pueden ser selectivos con distintos contaminantes inorgánicos y en algunos casos esta selectividad puede ser aún mayor que la presentada por compuestos químicos sintéticos. Los mecanismos de bioacumulación o bioadsorción suelen estar controlados por la preferencia de los metales por las distintas posiciones de enlace con los ligandos, por ejemplo el Cd^{2+} puede ser complejado por polifosfatos o por proteínas, presentes en el citoplasma, que contienen azufre, el metal puede precipitarse en el exterior de la célula como un fosfato de cadmio o como un sulfuro de cadmio. Esta precipitación tiene lugar porque el fósforo y el azufre son ligandos afines por el Cd^{2+} que es un ácido débil. Además de las paredes celulares, otros materiales extracelulares pueden dar lugar a la bioadsorción de metales. Algunos microorganismos producen polímeros en el exterior de la célula, que pueden absorber metales o radionucleidos de distintos medios y tienen una naturaleza ácida con distintos grupos funcionales que son los responsables de la coordinación con la especie inorgánica. La producción de los exopolímeros puede ser controlada con las condiciones de cultivo, incluyendo la fuente de obtención de carbono y nitrógeno y la presencia o ausencia de iones nutrientes o contaminantes (Gadd, G.M. y White, C., 1993).

1.9.1 Tipos de biomasa empleados para la bioadsorción.

A pesar de la gran cantidad de materiales biológicos que puede adsorber metales de forma natural, solamente unos pocos tienen la suficiente capacidad como para adsorber una gran cantidad de metal de forma eficiente y presentar una alta selectividad, dos características necesarias para ser empleados en un proceso de biosorción a gran escala. Numerosos materiales biológicos han sido estudiados con el fin de evaluar su potencial para la adsorción de metales pesados. Entre estos materiales, la biomasa bacteriana, hongos y algas marinas, constituyen el conjunto más estudiados hasta el momento. Además

de estos, se han empleado plantas, residuos derivados de la agricultura (cáscaras de coco, naranjas, manzanas, bananas, carozos de aceitunas, hojas de té, bagazo, entre otros)(Gadd, G.M. y White, C., 1993). También se estudió la capacidad de adsorción del caparazón de los crustáceos de donde se extrae un biopolímero, el quitosano responsable de la remoción de metales (Volesky, B., 1990).

Todos los materiales biológicos se caracterizan por la estructura y composición química de su pared celular. La estructura de la misma hace referencia a la rigidez, porosidad, flexibilidad, al efecto de hinchazón (dilatación y contracción por incorporación de agua durante el proceso de biosorción). La composición química refleja los diferentes grupos químicos que actuaran como sitios activos en la unión de los metales a la pared celular. Desde el punto de vista de la biosorción, tanto la composición química como la estructura influyen en la capacidad del material para la remoción de metales pesados. Asimismo determinan las modificaciones químicas o físicoquímicas que podrían aplicarse (pre-tratamiento o tratamiento) para inducir o mejorar la capacidad de adsorción del material biológico(Eccles H.,1999).

- **Bacterias:**

Gram +: Peptidoglicano (polímero lineal derivado de dos azúcares, N-acetilglucosamina y N-cetilmurámico).
Acidos teicoicos, lipoteicoicos y proteínas
(Mulligan CN., et al, 2001).

Gram -: Peptidoglicano, lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas (Mulligan CN., et al, 2001).

- **Hongos :**

80 a 90% polisacáridos (como glucanos, galactosa) con proteínas, lípidos, fosfolípidos, iones inorgánicos que conforman la matriz cementante de la pared celular (capa

externa) y otra interna de microfibras de polisacáridos (quitina o celulosa)(Eccles H.,1999).

- **Algas:**

Chlorophyta (algas verdes): Componente fibrilar de celulosa y una matriz amorfa compuesta de polisacáridos como, galactosa, ribosa, xilosa, ácido glucurónico, que pueden ser sulfonados. Las proteínas representan 10 al 70% del peso seco de la pared celular. Ofrece grupos funcionales como hidroxilos, carboxilos, sulfhidrilos, aminos, iminas, amidas, imidazolas(Volesky, 1990).

Rodophyta (algas rojas): Componente fibrilar de celulosa y los principales componentes de la matriz amorfa son los polisacáridos sulfonados como fucoides, galactasas (agar, carragenanos, etc.) constituyendo hasta el 70% del peso seco de su pared celular. Las proteínas representan un 35 – 50% de la pared celular(Volesky, 1990).

Phaeophyta (algas marrones): Componente fibrilar de celulosa y una matriz amorfa de alginato, que representa entre el 10 - 40% del peso seco. Las proteínas se encuentran presentes en un 35 – 50% (Volesky, 1990).

Las algas despiertan un especial interés en la investigación y desarrollo de nuevos materiales biosorbentes, debido no solamente a su alta capacidad de adsorción sino también a que se encuentran presentes en mares y océanos en cantidades abundantes y de fácil acceso (Volesky, 1990). Sin embargo, hay pocas publicaciones sobre biosorción empleando algas en relación a las existentes usando otros biomateriales (principalmente bacterias y hongos); más aún, hay unas pocas en lo que se refiere a sistemas multimetálicos y sistemas dinámicos(Volesky, 1990).

1.9.2 Biosorbentes disponibles en el mercado y sus aplicaciones industriales.

Actualmente en el mercado, se comercializan biosorbentes hechos con algas marinas y de agua dulce y bacterias cuyas denominaciones comerciales son: BIOCLAIMTM, ALGASORBTM, BIOFIXTM. ALGASORBTM, se compone de algas de agua dulce como *Chlorella vulgaris* y BIOCLAIMTM de biomasa de bacterias del género *Bacillus sp.* Ambos pueden remover eficientemente iones metálicos de soluciones diluidas (10 a 100 mg/L) y reducir la concentración de los mismos por debajo de 1 mg/L, además el proceso no se ve afectado por la presencia de otros iones como calcio y magnesio (Vijayaraghavan K, 2008).

BIOCLAIMTM, es capaz de adsorber, oro, cadmio, zinc de soluciones cianhídricas con una eficiencia del más del 99%. No es selectivo, y los metales pueden recuperarse usando H_2SO_4 , $Na(OH)$ y agentes complejantes, permitiendo que los gránulos del biosorbente pueden ser regenerados y reusados nuevamente en otro ciclo de adsorción. Respecto de ALGASORBTM, se comprobó mediante ensayos de laboratorio, que puede remover y reducir las concentraciones de cadmio y mercurio a niveles por debajo de los estándares requeridos para agua de bebida (Vijayaraghavan K, 2008).

BIOFIXTM, es una mezcla de biomásas, musgos, algas, levaduras, cianobacteria (*Spirulina sp.*), plantas (*Lemna sp.* y *Sphagnum sp.*). Esta mixtura de biomásas es tratada con goma de guar y xantanos que le confiere mayor resistencia y luego es inmovilizada en polisulfona. La adsorción de zinc a este biosorbente es cuatro veces más alta que a las resinas de intercambio iónico sintéticas. Tiene una marcada afinidad por los diferentes metales, según el siguiente orden: $Al(III) > Cd(II) > Zn(II) > Mn(II)$ y menor afinidad por $Mg(II)$ y $Ca(II)$. Los metales pueden ser eluidos usando HCl y HNO_3 y el biosorbente puede ser usado en más de 120 ciclos de extracción/elución (Vijayaraghavan K, 2008).

Otros biosorbentes comercializados son MetaGeneR y RAHCO Bio-beads, son efectivos para la remoción de metales pesados, aplicados a los efluentes

industriales de la galvanoplastia y de la minería. La información sobre sus aplicaciones industriales y otra información es limitada (Volesky, 1990).

1.10 PRUEBA DE TOXICIDAD UNIVERSAL CON PULGAS DE AGUA

El género *Daphnia* es el más utilizado como organismos de referencia en pruebas de toxicidad universal. La amplia distribución geográfica, el importante papel que cumplen al interior de la comunidad zooplanctónica, la facilidad de cultivo en el laboratorio, la reproducción partenogenética (lo cual asegura una uniformidad de respuesta) y el corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías, han hecho de este grupo un ideal para la evaluación de toxicidad, de carácter universal (Díaz *et al*, 2006).

El género *Daphnia* se ubica dentro del orden cladóceros de la clase crustácea, y especies como *Daphnia magna* (Figura N°3), *Daphnia pulex* y *Daphnia similis*, son utilizadas extensivamente en pruebas de toxicidad, por lo cual existe una extensa información sobre las técnicas de cultivo, los requisitos de temperatura, luz y nutrientes, así como su respuesta a muchos tóxicos. Específicamente, los ensayos de toxicidad con *Daphnia pulex* permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos, entre otros (Díaz *et al*, 2006).

1.10.1 Principio de la prueba.

En las pruebas de toxicidad con *D. magna*, neonatos menores de 24 hrs. de edad son expuestos a la muestra o compuesto a probar, por un período de 48 hrs., al término del cual se cuantifica el número de organismos muertos. Con estos resultados se establece la proporción o porcentaje de mortalidad producida (Díaz *et al*, 2006).



Figura N°3.

Vista general de *Daphnia magna*.Fuente: Ensayo de toxicidad aguda con el cladóceros *Daphnia magna* (Díaz *et al*, 2006).

1.10.2 Cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba.

Los cultivos de *Daphnia magna* pueden mantenerse en recipientes de 1, 2 o 3 L o cualquier otro sistema que resulte funcional. Con el fin de mantener condiciones óptimas para el crecimiento de los individuos, se recomienda mantener una densidad poblacional no mayor de 12 individuos por L. Los organismos se mantienen en agua reconstituida con una dureza entre 160 y 180 mg de CaCO_3/L . El agua se prepara en el laboratorio (APHA,1998) y puede suplementarse con una solución de vitaminas y selenio cuando se detecten problemas en la reproducción o se presente una alta mortalidad entre los 14 y 21 días por malformación de las antenas. Los cultivos se mantienen a una temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, un fotoperíodo aproximado de 16 hrs. luz : 8 hrs. oscuridad y una intensidad lumínica de alrededor de 800 luxes. Los suplementos alimenticios sólo se adicionan en caso de un crecimiento deficiente del cultivo (Díaz *et al*, 2006).

1.10.3 Limpieza y mantenimiento.

Para el mantenimiento del cultivo se sugiere aplicar un ciclo de renovación definido a criterio del analista. El ciclo permite mantener un cultivo de organismos en etapas óptimas de reproducción. Algunos autores (CETESB, 1991) recomiendan mantener lotes de individuos separados por edad, desde 0 a 1 semana hasta 4 o 5 semanas de la siguiente forma: Diariamente o cada tercer día dependiendo del desarrollo del cultivo, deben retirarse los neonatos, los cuales pueden ser destinados al desarrollo de pruebas o eliminados. Con igual periodicidad se deberá efectuar la limpieza y el suministro de alimento. Para la limpieza se emplea un sifón con el cual se remueven las exubias y los restos de alimento depositados en el fondo de los recipientes (Díaz *et al*, 2006).

Al finalizar, se recupera el volumen de agua en cada recipiente, adicionando o haciendo el recambio de 1/3 del volumen con agua reconstituida fresca. Una vez por semana, después del retiro de los neonatos y antes del suministro de alimento, se transfieren las hembras adultas a recipientes limpios conteniendo partes iguales del agua antigua y agua de dilución fresca. Se recomienda desechar los organismos mayores de cuatro o cinco semanas, reemplazarlos e iniciar un nuevo cultivo con los neonatos colectados ese día (Díaz *et al*, 2006).

Cuando se van a realizar pruebas, el día previo se extraen los neonatos presentes en el cultivo, para de esa forma garantizar que los neonatos encontrados al día siguiente tengan menos de 24 hrs. de nacidos (Díaz *et al*, 2006). El manejo se realiza como se muestra en el siguiente esquema (Figura N°4):

1.10.4 Alimentación.

Para la alimentación de los cultivos, se puede emplear suspensiones de diferentes especies de algas (*Selenastrum capricornutum*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., etc.). La alimentación con cultivos de *S. capricornutum* se realiza cada tercer día, después de la limpieza (Díaz *et al*, 2006).

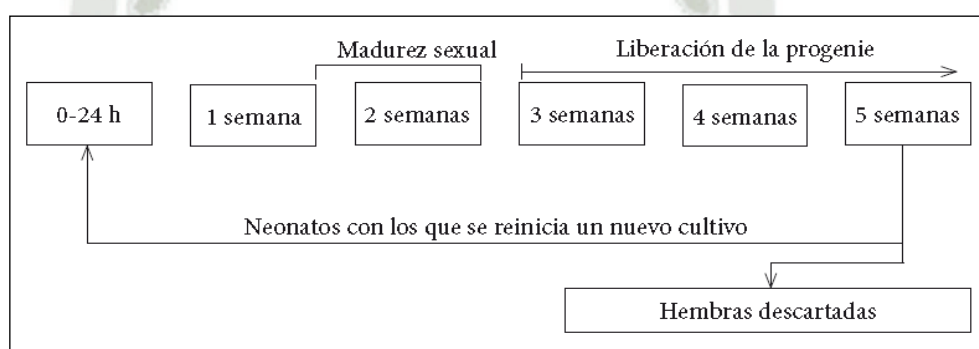


Figura N°4.
Cultivo de *Daphnia magna* y su ciclo de renovación.
Fuente: Ensayo de toxicidad aguda con el cladóceros *Daphnia magna* (Díaz *et al*, 2006).

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

Para el desarrollo de la investigación se realizó el aislamiento e identificación de la microalga *Chlorella vulgaris* de muestras de agua provenientes de efluentes de aguas residuales, para después evaluar su crecimiento en distintas concentraciones de Arsénico III, en función del tiempo, mediante la implementación de un sistema de flujo por gravedad con *Chlorella vulgaris* se evaluó la capacidad de bioabsorción de Arsénico, en efluentes industriales del PIRS, finalmente para ver la eficiencia del sistema implementado se realizó un bioensayo de toxicidad con *Daphnia magna*.

2.1 LUGAR DE EJECUCION

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en la Universidad Nacional de San Agustín. Los cultivos de la microalga se llevaron a cabo en las instalaciones del laboratorio del área de oceanografía de la escuela profesional de Biología.

2.2 MATERIALES

Para la ejecución del trabajo se utilizó material biológico, químico, equipos, entre otros, que a continuación se detalla:

2.2.1 Equipos:

- Aireadores.
- Autoclave, 280DH, 24 L. (Kert Lab)
- Balanza analítica de 0.1 mg - 3000 g (Digital Precision).
- Cámara de Newbauer, (Boheco).
- Centrífuga, de 30 mil rev./min., (Kert Lab)
- Espectrofotómetro de absorción atómica.

- Espectrofotómetro visible, 22PC, 340-1000 nm. (Kert Lab)
- Microscopio, 042B, 10X, 20X, 40X y 100X, (Labor Tech).
- Microscopio estéreo, ZTXE(Labor Tech).
- pHmetro, (Hanna).
- Termómetro ambiental, 0-100°C, (Hanna)
- Termostato, (Kyntel).

2.2.2 Material de vidrio:

- Matraces Erlenmeyer de 250 mL, (Boheco).
- Pipetas de 2 y 10 mL, (Kyntel).
- Pipeta de 1 mL, (Boheco).
- Pipeta de 10 mL, (Kyntel).
- Probeta de 250 mL, (Kyntel).
- Probeta de 500 mL, (Kyntel).
- Tubos de ensayo, 12x75 mL borosilicato (Giardino).
- Vasos de precipitado de 500 mL (Kyntel).

2.2.3 Reactivos:

- Agua destilada.
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, q.p. (Merck)
- $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, q.p. (Merck).
- $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, q.p (Merck).
- HCL 0,1 N, p.a. (Sigma).
- KCl, q.p. (Merck).
- $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Merck).
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, q.p. (Sigma).
- Na_2HAsO_3 q.p. (Merck).
- NaHCO_3 , q.p. (Merck).
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, q.p. (Sigma).

- Nitrogeno líquido, (Praxair).
- Peptona vegetal de soya, q.p. (Merck).

2.3 METODOS

2.3.1 Aislamiento de *Chlorella vulgaris* de muestras de agua provenientes de efluentes de aguas residuales.

Para el aislamiento de la microalga *Chlorella vulgaris*, se colectarán muestras de agua proveniente de los efluentes de la planta de tratamiento de Chilpina, en envases debidamente rotulados y esterilizados de 250 mL de capacidad, las muestras serán trasladadas inmediatamente al laboratorio para ser observadas a microscopio para comprobar la presencia de la microalga y ser incubada a condiciones de cultivo (aireación, 20°C y 16hrs. luz) en laboratorio. A partir de las muestras colectadas se realizarán diluciones hasta la obtención del cultivo puro de *Chlorella vulgaris* que se utilizará como inóculo. Para evitar el crecimiento de otros microorganismos en el aislamiento de *Chlorella vulgaris*, se aplicará ampicilina 25 µg/mL y cloranfenicol 35 µg/mL (Abdul Rehman Y A.R. Shakoori, 2004).

Para constatar que se trate de la alga *Chlorella vulgaris*, se enviará a analizar dichas muestras al Herbario de la UNAS (Anexo 3-E).

2.3.2 Evaluación del crecimiento *Chlorella vulgaris* en diferentes concentraciones de Arsénico III.

El análisis cuantitativo del crecimiento en microalgas consistirá en realizar un recuento de los organismos presentes en las muestras en tiempo dado mediante evaluaciones sucesivas, se evaluará mediante microscopía y el uso de una cámara cuadrículada (cámara de Neubauer), en la cual se hará el recuento de organismos por cada campo, considerándose dentro del recuento los organismos que estén sobre las líneas derecha y arriba más no las de la izquierda y abajo, muchas veces las muestras se someten a diluciones para facilitar el recuento (Serrano B., et al, 2011).

Para la evaluación del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en diferentes concentraciones de Arsénico III, se implementará un bioensayo mediante un diseño experimental completamente al azar (DCR):

- A) Tratamientos:** Se aplicarán tres concentraciones de Arsénico III: 1.6 mg/L, 3.2 mg/L y 6.4 mg/L en forma de Na_2HAsO_3 , y un grupo control el cual no presentará Arsénico.
- B) Repeticiones:** Se realizarán 6 repeticiones por tratamiento.
- C) Unidad experimental:** Se utilizarán matraces Erlenmeyer de 250ml de capacidad conteniendo un volumen de 200 ml de medio de cultivo albañal sintético para algas (Valiente, 1995) que contendrá; peptona 292 mg/L, NaHCO_3 250 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 18mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4 mg/L, KCl 19 mg/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 382 mg/L, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 346 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 13 mg/L y 50 mL de cultivo puro de *Chlorella vulgaris*, las unidades experimentales serán incubadas a luz artificial constante (16hrs. de luz), temperatura de 20°C y aireación constante.
- D) Evaluación y registros:** De las unidades experimentales se tomarán muestras periódicamente cada 5 días por un tiempo de 20 días, para evaluar el:
- Recuento de *Chlorella vulgaris*: Se realizará mediante el uso de una cámara de Newbauer y microscopio óptico a 10X. Tomándose 1 mL de cada unidad experimental al cual se le añadirá 9 mL de agua destilada (dilución 1:10) en tubos de ensayo, para el recuento de cada muestra se contaron 4 campos en una cámara de Newbauer, a la sumatoria de los campos se multiplicó por 16 (total de campos) y por 10 por ser la dilución utilizada (Serrano B., et al, 2011).

2.3.3 Diseño y Construcción del Sistema de Flujo por Gavedad

El proceso de bioabsorción se llevará a cabo por diferentes mecanismos dependientes: factores ambientales externos, tipo de metal, formación iónica en disolución y tipo de sitio activo responsable de captar cada metal. Marroquín G. y Garza G., 2004 evaluaron la contribución de grupos funcionales de la biomasa de *Chlorella vulgaris* y reportaron que los grupos carboxílicos, aminos y tioles tienen la mayor influencia sobre la remoción de metales pesados. Siendo así, se diseñará un sistema que favorezca la bioabsorción de Arsénico, se implementará un sistema de contenedores de plástico de 8 L de volumen, los mismos que presentaban cultivo inicial de 1.5 L de *Chlorella vulgaris*, cada contenedor presentará filtros de grava e interconectado con mangueras de pvc de ½ pulgada de diámetro, en número de 6 que conformarán todo el sistema de flujo por gravedad; el sistema estuvo montado en una estructura de melamina a modo de escalones y cada contenedor presentará un ángulo de inclinación de 9.5°, los efluentes del PIRS se colocarán en un tanque inicial en un volumen de 5 L., para evitar que la saturación de los contenedores. En el tanque inicial se ajustará las velocidades de flujo de los efluentes mediante una llave de paso, midiéndose el volumen por unidad de tiempo, para la construcción del sistema de flujo se considerarán las medidas precisadas en el ANEXO 6 .

2.3.3.1 Evaluación de la capacidad de bioabsorción de Arsénico mediante un sistema de flujo por gravedad con *Chlorella vulgaris*, en efluentes industriales del PIRS.

Para evaluar la bioabsorción de Arsénico presente en efluentes del PIRS se implementará un sistema de flujo por gravedad que se muestra en el siguiente diagrama (Figura N° 5):

contenedores interconectados mediante filtros con grava y conectores de PVC de ½ pulgada, los contenedores serán colocados en un soporte hecho de melanina para brindarle estabilidad, la regulación de la velocidad de flujo se realizará en el depósito del efluente, mientras que los demás contenedores presentarán los reguladores de flujo totalmente abiertos para asegurar la velocidad de flujo constante.

D) Evaluación y registros: Se tomarán muestras periódicamente cada 4 días por un lapso de 36 días, para evaluar:

- **Concentración de Clorofila A:** La concentración de Clorofila A, es una medida indirecta de biomasa de microalgas. El procedimiento para su análisis incluirá la concentración de microalgas, la extracción del pigmento con una solución acuosa de etanol absoluto (90%) y la determinación de la densidad óptica (absorbancia) del extracto por medio de un espectrofotómetro, este procedimiento está basado en Standard Methods (APHA, 1998).

Se tomarán muestras de 100 mL las cuales se concentrarán mediante centrifugación a 8 000 rpm. x 3 minutos, decantando el sobrenadante y sometiéndolo a nitrógeno líquido para su lisis, después se resuspenderá en un volumen de etanol absoluto hasta cubrir el precipitado que se mantendrá en refrigeración a 4°C en un frasco ámbar por 2 días. Al cabo de 2 días el extracto se centrifugará por 3 minutos a 8000 rpm. para su clarificación, separando el sobrenadante y anotándose el volumen total del extracto. Posteriormente se transferirá 1.5mL del extracto clarificado a una cubeta de espectrofotómetro de (1cm) de ancho registrándose la densidad óptica a 750 nm y 664 nm, luego se añadirá 0.05mL de HCl 0.1N agitando con cuidado el extracto acidificado y se registrará las absorbancias (DO750nm y DO665nm), 90 segundos después de la acidificación. Se restará las absorbancias obtenidas a 750nm (no-acidificada y acidificada) a las correspondientes lecturas que se obtendrán a 664nm antes de acidificary a 665nm

después de acidificar (la absorbancia registrada a 750 nm es una medida de la turbidez en el extracto). Utilizando los valores corregidos (DO_{664nm} y DO_{665nm}) se calculará la concentración de clorofila-a mediante la siguiente ecuación (APHA 1998):

$$\text{Clorofila-A (mg/m}^3\text{)} = \frac{26,7 \times (\text{DO}_{664:\text{antes}} - \text{DO}_{665:\text{después}}) \times \text{V1}}{\text{V2} \times \text{L}}$$

Donde:

V1 = volumen del extracto, expresado en litros (L).

V2 = volumen de la muestra, expresado en metros cúbicos (m³).

L = longitud paso de luz o ancho de la celda espectrofotométrica, expresado en centímetros (cm).

DO_{664nm}: antes = densidad óptica del extracto a 664nm antes de la acidificación.

DO_{665nm}: después = densidad óptica del extracto a 665nm después de la acidificación.

El valor 26.7 es un factor de corrección de la absorbancia igual a **A x K**, donde:

A = 11.0 (coeficiente de absorbancia de la clorofila-a, a 664nm).

K = 2.43 (factor de corrección por la acidificación).

- **Concentración residual de Arsénico:** Los efluentes tratados se colectarán periódicamente en un volumen de 250mL por cada repetición, los cuales se analizarán mediante espectroscopía de adsorción atómica, para determinar la concentración de Arsénico residual después de sometidos a los tratamientos del sistema de flujo por gravedad.

Para medir las muestras mediante esta técnica, las mismas serán diluidas con HNO_3 0.14 M y filtradas por membrana de 0,45 micrones para proceder a realizar la cuantificación mediante las siguientes especificaciones (Burguera, M., et al 1991):

- Longitud de onda 193,7 nm.
- Ancho de banda 1,5 nm
- Tiempo de integración 5 seg.
- Corriente de la lámpara 8,5 mA
- Aire - Acetileno (2,25 bar- 1,00 bar)

2.3.4 Determinación de la toxicidad de efluentes industriales del PIRS tratados con *Chlorella vulgaris*, en el cultivo de *Daphnia magna*.

El género *Daphnia*, es utilizada extensivamente en pruebas de toxicidad, permiten determinar la letalidad potencial de sustancias puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, y agua de sedimentos, entre otros. En las pruebas de toxicidad con *D. magna*, los neonatos menores de 24 hrs. de edad serán expuestos a la muestra o compuesto a probar, por un período de 48 hrs., al término del cual se cuantificará el número de organismos muertos. Con estos resultados se establece la proporción o porcentaje de mortalidad producida (Díaz *et al*, 2006).

Para la implementación del bioensayo se realizará el cultivo de *Daphnia magna* (pulga de agua) en 20 L de agua reconstituida la cual constará de: 19 L de agua destilada, 2.4 g de MgSO_4 , 3.84 g de NaHCO_3 y 0.16 g de KCl, paralelamente se disolverá 2.4 g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 1 L de agua destilada y se añadirá a los 19 L de la primera solución (Díaz *et al*, 2006). Las pulgas de agua cultivadas en agua reconstituida, serán separadas por edad y solo se utilizarán neonatos de entre 0 a 24 hrs., los que se colocarán 1 día antes del ensayo de toxicidad en número de 10 por envase de vidrio de 300 mL de volumen, conteniendo las siguientes diluciones del efluente tratado:

Dilución 1 (0% de efluente): agua reconstituida solamente 250 mL,

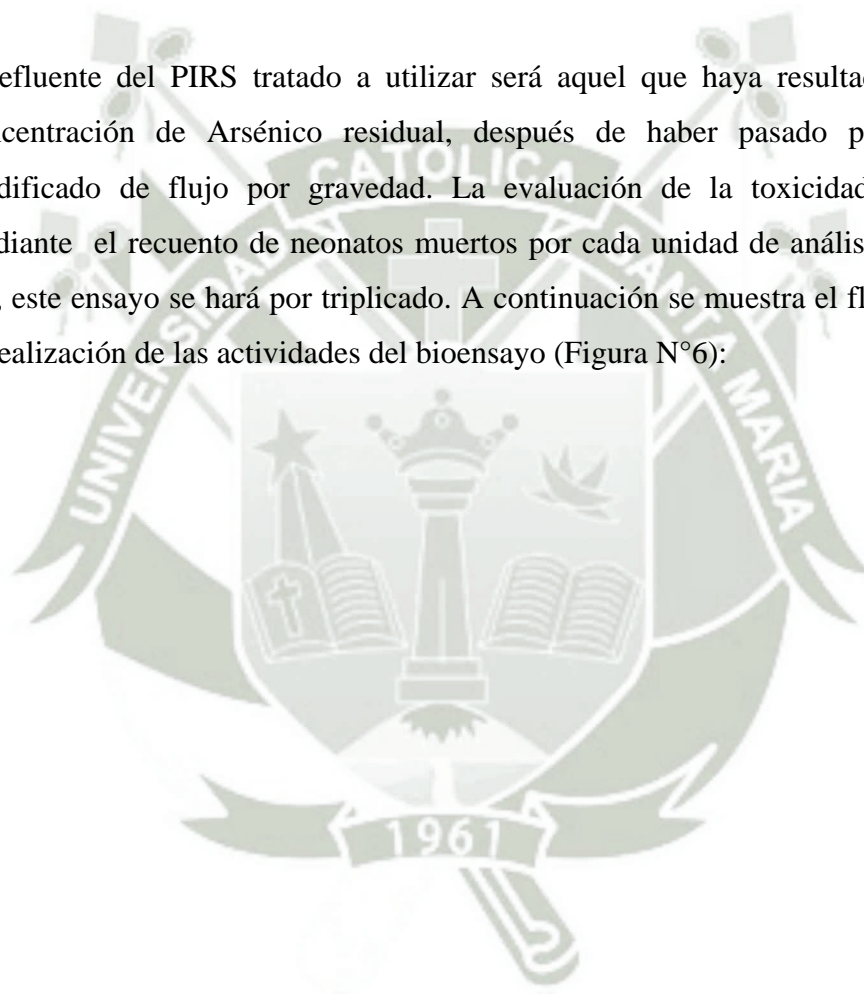
Dilución 2 (25% de efluente): 187.5 mL de agua reconstituida y 62.5 mL del efluente del PIRS tratado.

Dilución 3 (50% de efluente): 125 mL de agua reconstituida y 125 mL del efluente del PIRS tratado.

Dilución 4 (75% de efluente): 62.5 mL de agua reconstituida y 187.5 mL del efluente del PIRS tratado.

Dilución 5 (100% de efluente): solamente efluente del PIRS tratado 250 mL.

El efluente del PIRS tratado a utilizar será aquel que haya resultado con menor concentración de Arsénico residual, después de haber pasado por el sistema modificado de flujo por gravedad. La evaluación de la toxicidad, se realizará mediante el recuento de neonatos muertos por cada unidad de análisis hasta las 48 hrs, este ensayo se hará por triplicado. A continuación se muestra el flujograma para la realización de las actividades del bioensayo (Figura N°6):



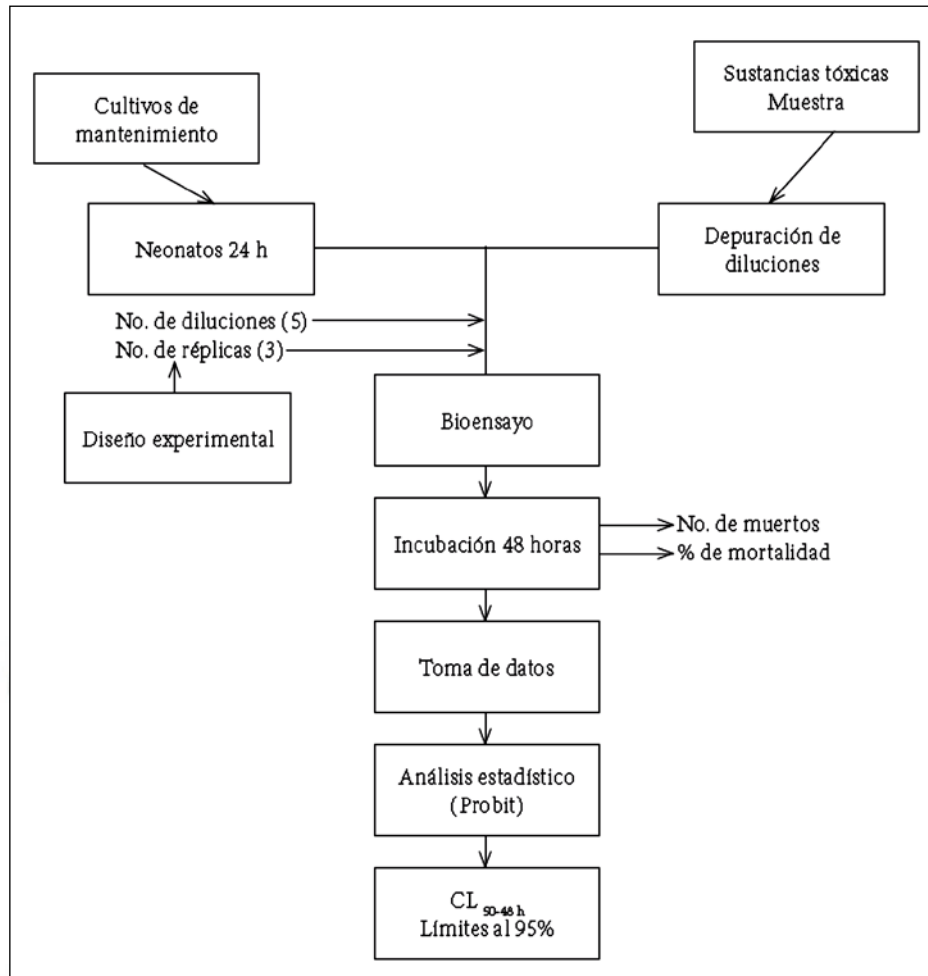


Figura N° 6.
Diagrama de flujo de las actividades vinculadas al desarrollo del ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*
Fuente: elaboración propia

2.3.5 Análisis y procesamiento de datos

2.3.5.1) Evaluación del crecimiento *Chlorella vulgaris* en diferentes concentraciones de Arsénico III.

Para el procesamiento de los datos correspondientes al recuento de células de *Chlorella vulgaris* de los distintos tratamientos para las evaluaciones realizadas, se empleará la prueba de comparación múltiple de análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA de medidas repetidas) y la prueba de especificidad de Tukey, para determinar la diferencia entre tratamientos y en diferentes tiempos de evaluación, se detallarán también los promedios y estadísticos descriptivos por tratamiento, el procesamiento se realizará mediante el software estadístico SPSS versión 20, y las representaciones gráficas se efectuarán mediante el software Graph Pad Prism 6.

2.3.5.2) Evaluación de la capacidad de bioabsorción de Arsénico mediante un sistema modificado de flujo por gravedad con *Chlorella vulgaris*, en efluentes industriales del PIRS.

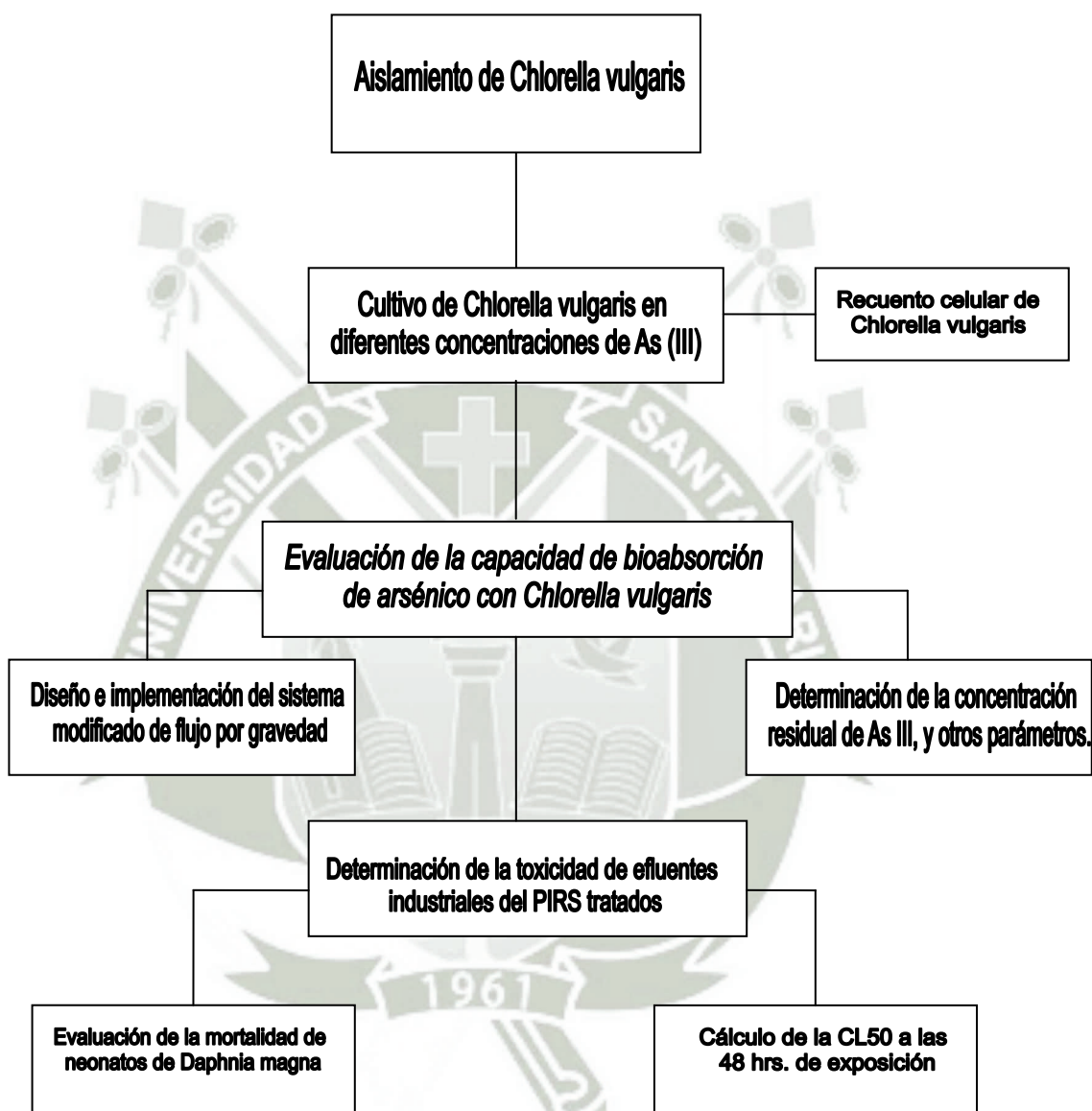
Para el procesamiento de los datos correspondientes de la concentración de Clorofila A y la concentración de Arsénico residual de efluentes del PIRS de las distintas velocidades de flujo en el sistema por gravedad, se emplearán la prueba de comparación múltiple de análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de especificidad de Tukey para determinar la diferencia entre tratamientos, se detallarán también los promedios y estadísticos descriptivos por tratamiento, el análisis se realizará mediante el software estadístico SPSS versión 20, y las representaciones gráficas se efectuarán mediante el software Graph Pad Prism 6.

2.3.5.3) Determinación de la toxicidad de efluentes industriales del PIRS tratados con *Chlorella vulgaris*, en el cultivo de *Daphnia magna*.

Los datos de mortalidad se expresarán en porcentajes para las diferentes concentraciones del efluente del PIRS tratado a las 48hrs. de exposición, mediante el análisis estadístico de PROBIT se obtendrá la concentración letal media (CL_{50}), así mismo se determinará las probabilidades de mortalidad por cada concentración del efluente tratado, el análisis se realizará mediante el software estadístico SPSS versión 20, y las representaciones gráficas se efectuarán mediante el software Graph Pad Prism 6.



2.4. FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES.



CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 AISLAMIENTO DE *Chlorella vulgaris* DE MUESTRAS DE AGUA PROVENIENTES DE EFLUENTES DE AGUAS RESIDUALES.

El aislamiento de *Chlorella vulgaris* se realizó de efluentes de la planta de tratamiento de Chilpina, las muestras fueron colectadas en frascos estériles debidamente rotulados y posteriormente incubados a temperatura de 20°C (temperatura optima de cultivo) y aireación constante, 24 hrs. de la colecta se procedió a preparar diluciones sucesivas hasta obtener el cultivo puro de *Chlorella vulgaris* como se muestra en la Figura N° 7.



Figura N° 7: Aislamiento de *Chlorella vulgaris*.

Se observa en la Figura N° 7a) muestra colectada sin dilución a 40X, diversas especies de microalgas, b) muestra con dilución de 1:10 a 40X, *Chlorella vulgaris* con otra microalga, c) muestra con dilución de 1:100 a 40X, cultivo puro de *Chlorella vulgaris*

Para evitar el crecimiento de otros microorganismos en el aislamiento de *Chlorella vulgaris* (Figura N°7), se aplicó ampicilina (25 µg/mL) y cloranfenicol (35 µg/mL) conforme a lo descrito por (Abdul Rehman Y A.R. Shakoory, 2004) en el que reportan la aplicación adicional de (25 µg/mL) de gentamicina para la evaluación de

la tolerancia y la absorción de cadmio y níquel por *Chlorella sp.* aislado de efluentes de tenería, pese a la no aplicación de esta dosis de gentamicina para evitar el crecimiento principalmente de bacterias y protozoarios, no se reportaron indicios del crecimiento de estos en el cultivo puro de *Chlorella vulgaris* para nuestra investigación, por lo que no fue necesario la aplicación de este antibiótico. Los parámetros de pH 7.2 y 20°C de temperatura fueron los óptimos para la obtención de una cantidad considerable de biomasa, conforme a lo reportados por (Barsanti *et al.*, 2006), dichos parámetros fueron controlados a condiciones de laboratorio.

3.2 EVALUACION DEL CRECIMIENTO *Chlorella vulgaris* EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ARSENICO III.

Una vez aislada la *Chlorella vulgaris*, se realizó un cultivo puro en matraces de 250mL a los cuales se les aplicó diferentes concentraciones de Arsénico III (1.6, 3.2 y 6.4 mg/L) en forma de Na_2HAsO_3 , realizándose 4 evaluaciones cada 5 días por espacio de 20 días mediante recuento en cámara de Newbauer, para después ver el efecto en el crecimiento en función al tiempo y las concentraciones de Arsénico III, como se muestra en la Figura N°8.



Figura N° 8: Implementación del cultivo para la evaluación del crecimiento de *Chlorella vulgaris* a diferentes concentraciones de Arsénico III.

Se observa en la Figura N° 8 **a)** el montaje del sistema de aireación en matraces Erlenmeyer de 250 mL, junto al cultivo puro de *Chlorella vulgaris* utilizado como inóculo para la absorción de Arsénico III, **b)** incubación a temperatura, aireación

iluminación constantes de las unidades experimentales en la evaluación del crecimiento de *Chlorella vulgaris* a diferentes concentraciones de Arsénico III.

Se muestran los valores del ANOVA de medidas repetidas para el crecimiento de *Chlorella vulgaris* en distintas concentraciones de Arsénico III en forma de Na_2HAsO_3 , como se muestra en la Tabla N° 1.

TABLA N° 1
EVALUACION Y COMPARACION DEL CRECIMIENTO *Chlorella vulgaris*
EN DIFERENTES TIEMPOS DE EVALUACION Y
CONCENTRACIONES DE ARSENICO III.

<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F</i>	<i>Significancia P</i>
Evaluación	11889827400.000	3	3963275800.000	100.991	0.000...(P<0.01)
Evaluación x Tratamientos	1713733933.334	9	190414881.482	4.852	0.000...(P<0.01)
Error	2354635466.667	60	39243924.444		

En la Tabla N°1., de acuerdo al valor estadístico de Fisher (F), se determina la presencia de diferencias altamente significativas en las evaluaciones realizadas para el crecimiento de *Chlorella vulgaris* (P<0.01), así mismo se muestran diferencias altamente significativas en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* con la interacción Evaluaciones x Tratamientos (P<0.01).

El crecimiento de *Chlorella vulgaris* se evaluó en presencia de Arsénico III por ser el estado más lábil y biotóxico (Lillo, 2003), sin embargo los resultados obtenidos (Tabla N°1) muestran que el crecimiento de la microalga no se ve afectado por las concentraciones de Arsénico III a las que fue sometida, resultado que demostraría que el Arsénico III estaría presentándose en formas orgánicas, ya que estas suelen aparecer en concentraciones menores que las especies inorgánicas, aunque pueden

incrementar su proporción como resultado de reacciones de metilación catalizadas por actividad microbiana (bacterias, algas), estas formas orgánicas dominantes que estarían presentándose en el cultivo de *Chlorella vulgaris*, serían el ácido dimetilarsínico {DMAA, $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$ } y el ácido monometilarsínico {MMAA, $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$ }, donde el arsénico está presente en ambos casos como Arsénico V (Torralba, 1996), especies de arsénico que se encuentran comúnmente en bacterias y algas. El crecimiento de *Chlorella* en presencia de Arsénico III demuestra en forma indirecta la bioabsorción del metal a pH 7, ya que a pH mayores a 6 son apropiados para la remoción de As III (Biswas *et al.* 2008).

Se evaluó el crecimiento de *Chlorella vulgaris* a tres concentraciones de Arsénico III, como se observa en la Figura N° 9.

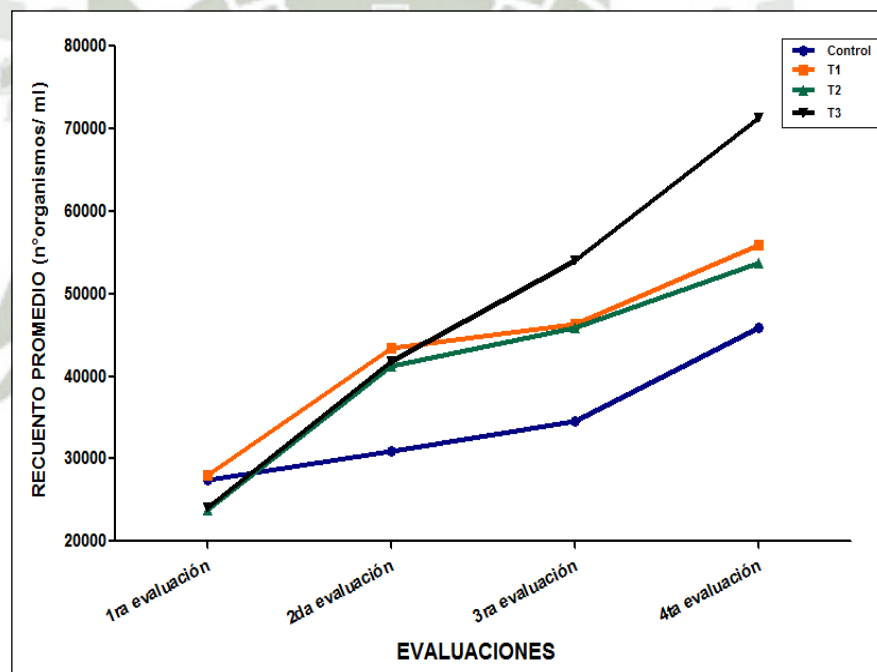


Figura N° 9: Crecimiento *Chlorella vulgaris* según concentraciones de Arsénico III

Se observa un incremento en el número de células de *Chlorella vulgaris* hasta la cuarta evaluación, presentándose mayor crecimiento promedio en el tratamiento T3 (6.4 mg/L) con 71333.34 organismos/mL, mostrándose también mayor crecimiento de *Chlorella vulgaris* en los tratamientos en comparación con el grupo control.

Se tomó como concentración de referencia de Arsénico III (3.2 mg/L) en forma de Na_2HAsO_3 , reportada por (Lazo R. 2009). en la investigación, efecto de la fitoextracción de As, Cr, Cd, Cu, Hg y Pb en la supervivencia, crecimiento de plántulas de *Chenopodium murale*, *Baccharis salicifolia*, *Eleocharis montevidensis* y *Tessaria integrifolia* y su relación con la respuesta fisiológica y proteómica, por ser el antecedente más próximo en investigaciones realizadas para nuestro medio con Arsénico III.

En el (Figura N° 9) se detalla un aumento progresivo en el recuento de *Chlorella vulgaris* hasta la última evaluación y más aún con la mayor concentración de Arsénico III (6.4 mg/L), resultados que demostrarían la transformación progresiva de una forma tóxica de Arsénico como es la de Arsénico III inorgánico, a formas orgánicas menos tóxicas, para permitir de esta manera el crecimiento de la microalga y por consiguiente un aumento en la bioabsorción del metal, seguramente debido a la presencia de más superficie de absorción, ya que las algas que se mueven libremente por el medio retienen una mayor cantidad de metales que las algas fijas a un sustrato (Xianhai Z. et al., 2012).

Se muestran en la Tabla N°2 los valores del ANOVA para los promedios del crecimiento de *Chlorella vulgaris*.

TABLA N° 2
EVALUACION Y COMPARACION DEL PROMEDIO DE CRECIMIENTO
***Chlorella vulgaris* EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE**
ARSENICO III.

<i>Fuente de variabilidad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F</i>	<i>Significancia</i>
Tratamientos	2142703133.334	3	714234377.778	3.350	0.040 (P<0.05)
Error	4264697866.667	20	213234893.333		

En la Tabla N°2., se determinan de acuerdo al valor estadístico de Fisher (F), la presencia de diferencias significativas ($P < 0.05$), en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* con la aplicación de tres concentraciones de Arsénico III.

La diferencia estadística en la comparación de promedios del crecimiento en el cultivo de *Chlorella vulgaris* hasta los 20 días de evaluación en las concentraciones de Arsénico III (Tabla N° 2), es un indicador de la resistencia de esta microalga frente a la presencia de arsénico como se precisa en la evaluación de la tolerancia y la absorción de cadmio y níquel por *Chlorella sp.*, aislado de efluentes de tenería (Abdul Rehman y A.R. Shakoori, 2004) donde se demuestra la resistencia de la microalga contra metales pesados presentes en efluentes industriales, representando de esta manera un medio eficiente para resistir, tolerar o procesar iones metálicos, como el arsénico.

Para determinar en qué tratamiento se obtuvo mayor y menor crecimiento de *Chlorella vulgaris* se empleó la prueba de comparación múltiple de Tukey, como se muestra en la Figura N° 10.

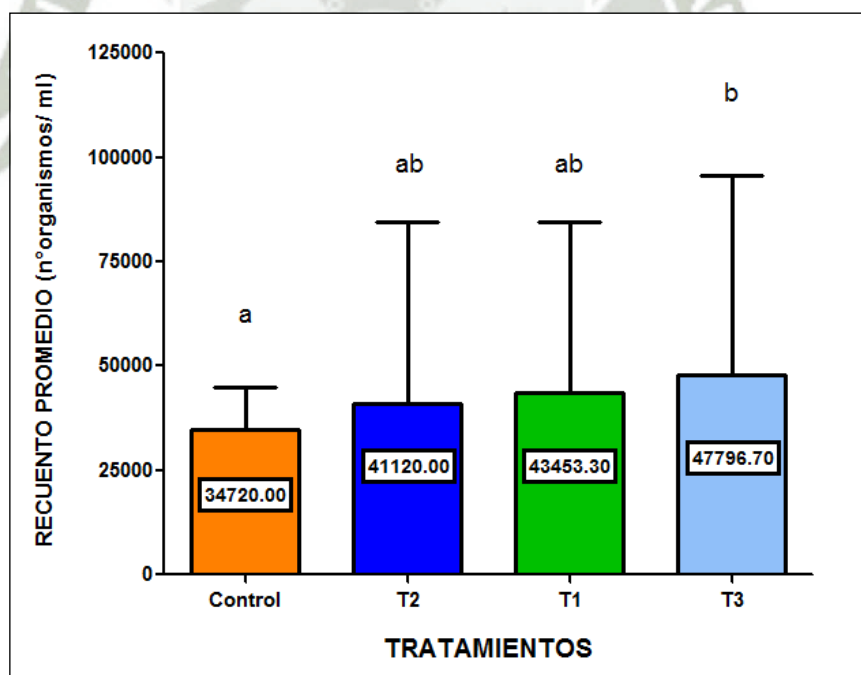


Figura N° 10: Prueba de comparación múltiple para el crecimiento promedio de *Chlorella vulgaris* en diferentes concentraciones de Arsénico III.

La Figura N°10 muestra la presencia de dos grupos (a y b), siendo el tratamiento T3 (6.4 mg/L) (b) el que presentó mayor crecimiento de *Chlorella vulgaris* con un promedio de 47796.70 organismos/ml (b) seguido de los tratamientos T1 y T2, siendo el grupo control el que presentó menor crecimiento promedio con 34720.00 organismos/mL (a).

En el proceso de bioabsorción de metales se presentan factores que influyen en una mayor eficiencia del mismo, uno de ellos es la densidad de la microalga así una alta densidad (5×10^5 organismos/ mL) de microalgas que se mueven libremente por el medio retienen una mayor cantidad de metales que las algas fijas a un sustrato, seguramente debido a la presencia de más superficie de absorción. No obstante lo inverso ocurre al considerar algas libres con una baja densidad (2×10^5 organismos/ mL), evidenciado en la remoción y evaluación de la toxicidad de Cu y Fe mediante células libres e inmovilizadas de *Anabaena doliolum* y *Chlorella vulgaris*. (Rai L.C. y Mallick N., 1992), la máxima densidad obtenida (47796.67 organismos/ml) en presencia de (6.4 mg/L) de Arsénico III detallada en la Figura N°10 es muy próxima a una alta densidad (5×10^5 organismos/ mL).

Este resultado explicaría una buena bioabsorción de Arsénico, la misma que es medida indirectamente por el crecimiento de *Chlorella vulgaris* en presencia de Arsénico III, el cual se evaluó mediante Recuento (Figura N°11).

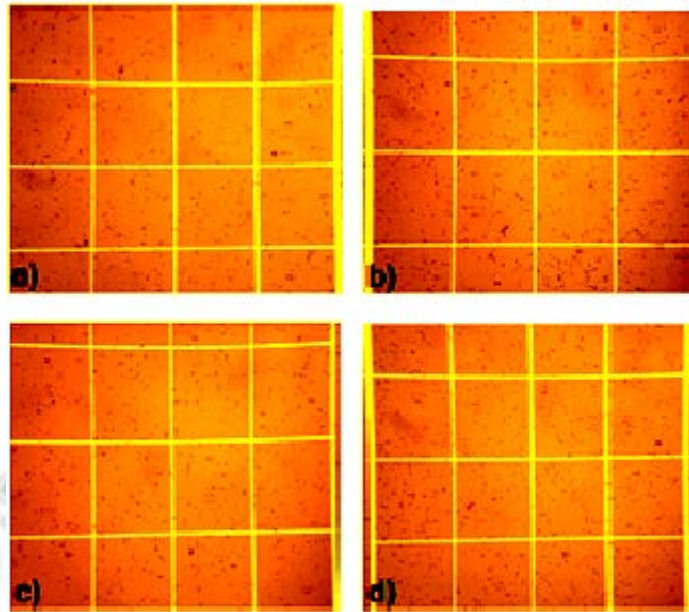


Figura N° 11: Recuento de *Chlorella vulgaris* en cámara de Newbauer.

Se observa en la Figura N° 11 el recuento de *Chlorella vulgaris* en cámara de Newbauer a) grupo control a 10X, b) tratamiento T1 (1.6 mg/L) de Arsénico III a 10X, c) tratamiento T2 (3.2 mg/L) de Arsénico III a 10X, d) tratamiento T3 (6.4 mg/L) de Arsénico III a 10X.

3.3 DISEÑO Y CONSTRUCCION DEL SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD PARA *Chlorella vulgaris* A ESCALA DE LABORATORIO.

Para la implementación del sistema de flujo por gravedad, se construyó un soporte de melamina blanca de 15mm de espesor, con 147 cm de alto y 220.5 cm de base; y 6 escalones de 21cm de altura, 31 cm de ancho y 40cm de largo para los contenedores y el primer escalón de 21cm de alto, 34.5cm de ancho y 40cm de largo sobre el cual se colocó el depósito del efluente de 120 cm de alto 25 cm de ancho y largo 30 cm, que contenía 5 L de efluente del PIRS, con un regulador para controlar la velocidad de flujo hacia los 6 contenedores inclinados con un ángulo de 9.5°. Cada contenedor es de material de plástico transparente de 23 cm de ancho, 36 cm de largo y 11cm de alto con un filtro de grava de 10cm de largo y ½ pulgada de diámetro, la conexión de estos fue mediante mangueras de PVC de ½ pulgada de diámetro. El efluente tratado después del paso por los 6 contenedores con biomasa de *Chlorella vulgaris* fue

depositado en el contenedor del efluente tratado de 23 cm de ancho, 36 cm de largo y 11cm de alto. El diseño del sistema de flujo por gravedad esta basado en el tratamiento de aguas mediante aireadores por gravedad en los que se utilizan la energía liberada cuando el agua pierde altitud al aumentar el área superficial aire-agua, por lo tanto se incrementa la concentración de oxígeno. Estos son ampliamente usados en acuicultura, debido a que son de fácil diseño y económicos, comúnmente se los denomina aireadores de cascada o cataratas (Galli M., 2007).

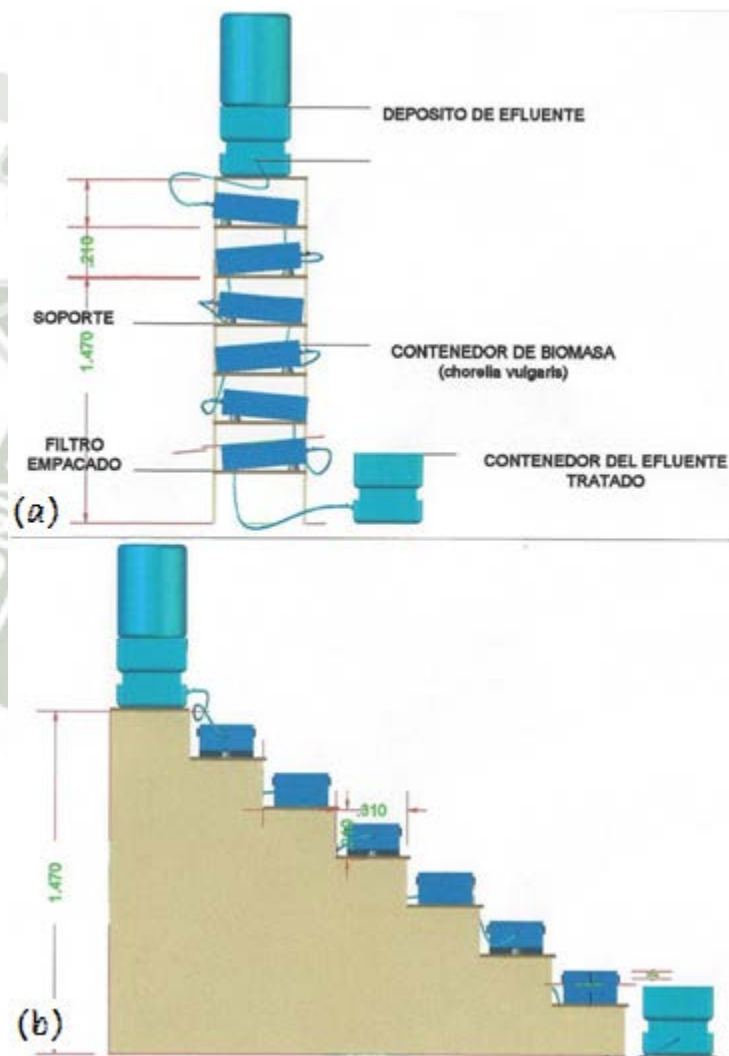


Figura N°12: Sistema de Flujo con medidas para su Construcción

En la Figura N°12 Sistema de Flujo: (a) vista frontal, (b) lateral izquierda, en ambas figuras (a y b) se observan las medidas de los diferentes materiales empleados para la construcción del mismo.

3.3.1 EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE BIOABSORCION DE ARSENICO EN UN SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD CON *Chlorella vulgaris*.

La capacidad de bioabsorción de Arsénico de efluentes del PIRS con *Chlorella vulgaris*, se evaluó mediante la concentración de Clorofila A como indicador de biomasa y mediante la concentración residual de Arsénico después de someter los efluentes a diferentes velocidades de flujo (20, 40 y 80 mL/min.) en un sistema de flujo por gravedad, construido mediante contenedores interconectados empacados con 1.5L cultivo puro de *Chlorella vulgaris*, donde la biomasa libre de la microalga entra en contacto con el Arsénico presente en los efluentes, el flujo en el sistema es solamente por gravedad sin necesidad de una bomba que impulse el flujo del efluente.

La concentración de Clorofila A se evalúa para medir la bioabsorción de Arsénico de efluentes, como se muestra en la Tabla N°3.

TABLA N° 3.
EVALUACION Y COMPARACION DE LA CONCENTRACION DE CLOROFILA A DE *Chlorella vulgaris* EMPACADA EN UN SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD PARA LA REMOCION DE ARSENICO EN EFLUENTES INDUSTRIALES DEL PIRS.

MUESTRA	Conc. de Clorofila A (mg/m^3)	Significancia	
	$\bar{X} \pm S$	F	P
CULTIVO DE <i>C. vulgaris</i>	153.85 \pm 6.44		
SISTEMA A 20 mL/min.	81.52 \pm 9.15		0.00003
SISTEMA A 40 mL/min.	36.74 \pm 2.07	237.13	A.S.
SISTEMA A 80 mL/min.	40.18 \pm 4.51		P<0.01

C.V.= 7.85%

Se observa en la Tabla N° 3, los promedios de la Concentración de Clorofila A del cultivo puro de *Chlorella vulgaris* expresados en (mg/m^3) y del cultivo empacado en el sistema de flujo por gravedad a tres diferentes velocidades de flujo (20, 40 y 80 mL/min.) con sus respectivas desviaciones estándar, se detallan también los valores de la prueba estadística de comparación empleada “Análisis de Varianza”, siendo para dicha prueba el valor del estadístico de $F = 237.13$, el cual demuestra que existe diferencias altamente significativas (A.S.) en la concentración de Clorofila A de *Chlorella vulgaris*, del cultivo puro y la empacada en el sistema de flujo por gravedad a diferentes velocidades de flujo $P < 0.01$. El Coeficiente de Variación (C.V.=7.85%), demuestra que la variabilidad originada es producto de la aplicación de los tratamientos.

La tabla N°3 demuestra el efecto del Arsénico en la concentración de clorofila A esto se explicaría, porque la primera etapa de la fotosíntesis es la absorción de la luz por la clorofila, una porfirina con un ion Mg^{+2} coordinado. (Azeez y Bonerjee, 1987) en la evaluación de la influencia de luz en la concentración de Clorofila A de algas verde azules tratadas con metales pesados, mencionan que el Pb actúa sobre la clorofila, desplazando al Mg^{+2} y cambiando consecuentemente las propiedades fisicoquímicas de dicho pigmento, ya que al estar ausente este metal, impide que se forme la protoporfirina IX y por consiguiente la protoclorofila, es muy probable que otros metales como el Arsénico causen el mismo efecto.

Para determinar a qué velocidad se obtuvo mayor y menor concentración de Clorofila A se empleó la prueba de comparación múltiple de Tukey, como se muestra en la Figura N° 13.

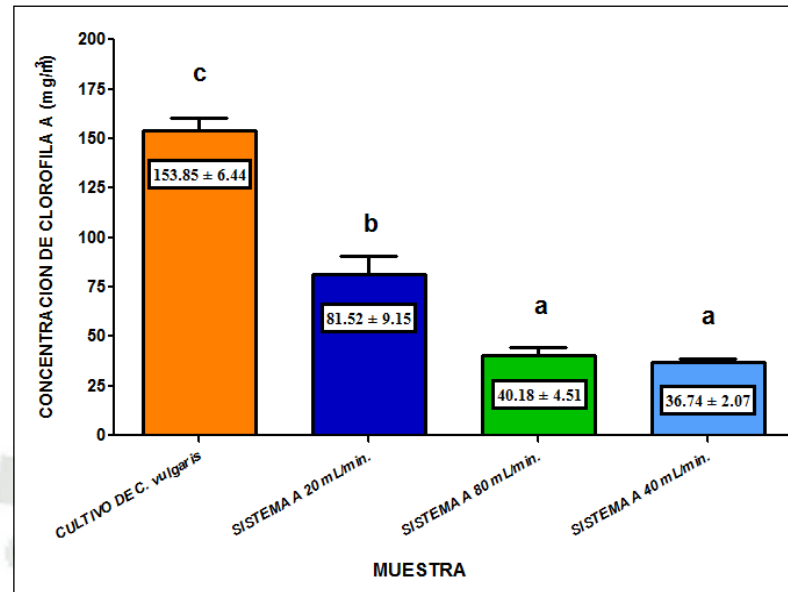


Figura N° 13: Prueba de comparación múltiple para la concentración de Clorofila A en un sistema de flujo por gravedad con *Chlorella vulgaris*, en efluentes industriales del PIRS.

La Figura N° 13 muestra la presencia de tres grupos (a, b y c), siendo el cultivo puro de *Chlorella vulgaris* el que presentó mayor concentración de Clorofila A con un promedio de 153.85 mg/m³ (c) seguido de la concentración de Clorofila A sometida a 20 mL/min en el sistema de flujo por gravedad con un promedio de 81.52 mg/m³ (b), siendo las velocidades de flujo de 40 y 80 mL/min las que presentaron menor concentración promedio de Clorofila A con 36.74 y 40.18 mg/m³ (a) respectivamente.

En la Figura N° 13, se puede observar que, aún cuando la producción del pigmento fotosintético disminuye significativamente con respecto al valor promedio del cultivo puro de *Chlorella*, se mantiene en valores que permite inferir una viabilidad celular aún en presencia de Arsénico; lo que demuestra la resistencia de la *Chlorella vulgaris* a la presencia de metales en el medio de cultivo empacado en el sistema de flujo por gravedad. Posiblemente esta adaptación se deba a un equilibrio en la producción de restos de clorofila y carotenos, ya que (Marin N., et al 1998) reportan de la acción protectora de los carotenos sobre la fotooxidación de la clorofila A ante un estrés tóxico en la evaluación del efecto de la concentración de nitrato en el

crecimiento y la síntesis de pigmentos de *Dunaliella salina* cultivada a baja iluminación y preadaptada a diferentes salinidades.

La concentración de Clorofila A disminuye conforme aumenta la velocidad de flujo en el sistema de flujo por gravedad (Figura N° 13), indicando el aumento de biomasa al disminuir la velocidad de flujo, puesto que una menor velocidad de flujo indica un mayor tiempo de retención en el sistema de flujo, tiempo en el que se daría la reposición de biomasa, la mayor concentración de Clorofila A (81.52 mg/m^3 ó 0.08152 mg/L) es menor a $0,2010 \text{ mg/L}$ reportado por (Marcano, *et al.*, 2010) en la evaluación de los cambios ultraestructurales de adaptación de la microalga *Scenedesmus sp* al estrés inducido por cadmio y vanadio (Cd y V), demostrando un mayor efecto de Arsénico en la biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris* que el ocasionado por Cd y V en la microalga *Scenedesmus sp*, probablemente debido a mayores alteraciones en la organización de los cloroplastos (Fernández L. y Novillo A., 1996).

Se observa en la Figura N° 14a) la extracción de Clorofila A después de la clarificación con etanol absoluto, para cada muestra siendo los del cultivo puro y a 20 mL/min las muestras con mayor concentración de clorofila, b) volumen de los extractos clarificados necesarios para la determinación de Clorofila A.

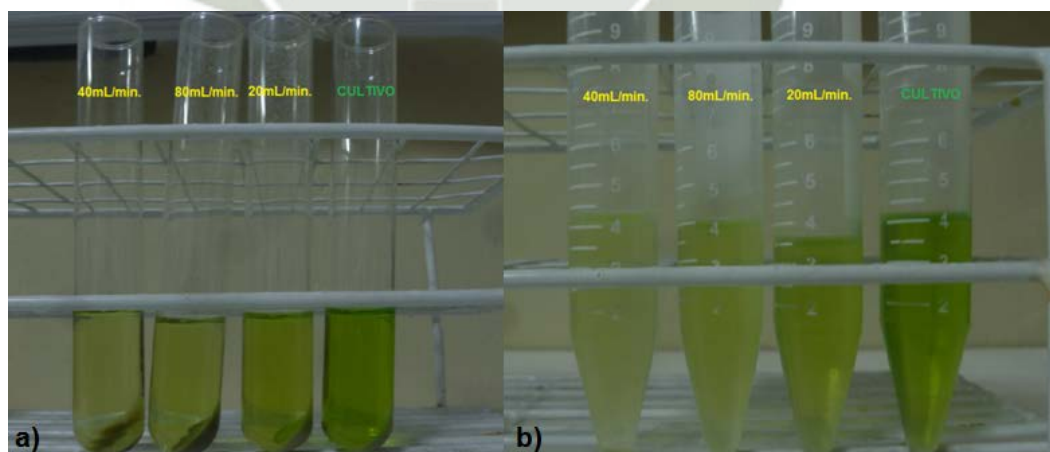


Figura N° 14: Concentración de Clorofila A de *Chlorella vulgaris*:

En la Tabla N°4 se detallan a continuación los valores de la prueba estadística de comparación “Análisis de Varianza”.

TABLA N° 4.
EVALUACION Y COMPARACION DE LA CONCENTRACION
RESIDUAL DE ARSENICO DEEFLUENTES INDUSTRIALES DEL PIRS
(PARQUE INDUSTRIAL DE RIO SECO) MEDIANTE UN SISTEMA DE
FLUJO POR GRAVEDAD CON *Chlorella vulgaris*.

<i>MUESTRA</i>	<i>Conc. de Arsénico (mg/L)</i>	<i>Significancia</i>	
	$\bar{X} \pm S$	<i>F</i>	<i>P</i>
EFLUENTES	11.09 ± 0.96		
SISTEMA A 20 mL/min.	4.43 ± 1.20	22.83	0.0002
SISTEMA A 40 mL/min.	8.46 ± 0.97		A.S.
SISTEMA A 80 mL/min.	10.32 ± 1.14		P<0.01

C.V.= 12.57%

Se observa en la Tabla N° 4, los promedios de la Concentración residual de Arsénico de los efluentes del PIRS expresados en (mg/L) y después de someter los efluentes a un sistema de flujo por gravedad a tres diferentes velocidades de flujo (20, 40 y 80 mL/min) con sus respectivas desviaciones estándar, siendo para dicha prueba el valor del estadístico de $F = 22.83$, el cual demuestra que existe diferencias altamente significativas (A.S.) en la concentración de Arsénico residual, de los efluentes del PIRS y de los efluentes sometidos a un sistema de flujo por gravedad a diferentes velocidades de flujo $P < 0.01$. El Coeficiente de Variación (C.V.=12.57%), demuestra que la variabilidad originada es producto de la aplicación de los tratamientos.

La concentración de Arsénico en los efluentes del PIRS disminuyen después de pasar por el sistema de flujo por gravedad (Tabla N° 4), evidenciado por una concentración menor de Arsénico con las diferentes velocidades de flujo en relación a la concentración inicial de Arsénico en los efluentes, esta reducción en la concentración de Arsénico es debida a la absorción que se da por parte del cultivo de *Chlorella*

vulgaris empacada en el sistema, dicha bioabsorción estaría mediada por el componente fibrilar de celulosa y una matriz amorfa compuesta de polisacáridos como, galactosa, ribosa, xilosa, ácido glucurónico presentes en la pared celular de la microalga, que pueden ser sulfonados, y a que las proteínas representan del 10 al 70% del peso seco de la pared celular y ofrecen grupos funcionales como hidroxilos, carboxilos, sulfhidrilos, aminos, iminas, amidas, imidazolas, potencialmente forman uniones con los metales (Sánchez et al., 2003), también se ha descrito que los microorganismos retienen internamente metales pesados y lo hacen por complejación con diversos ligandos citoplasmáticos como los polifosfatos o las proteínas (Volesky, B., 1990). Las posibilidades de este tipo de procesos sobre un gran número de cationes y radionucleidos utilizando bacterias, hongos y algas se han puesto de manifiesto más frecuentemente hoy en día.

Para evaluar la concentración residual de Arsénico se empleó la Prueba de comparación múltiple de Tukey (Figura N°15).

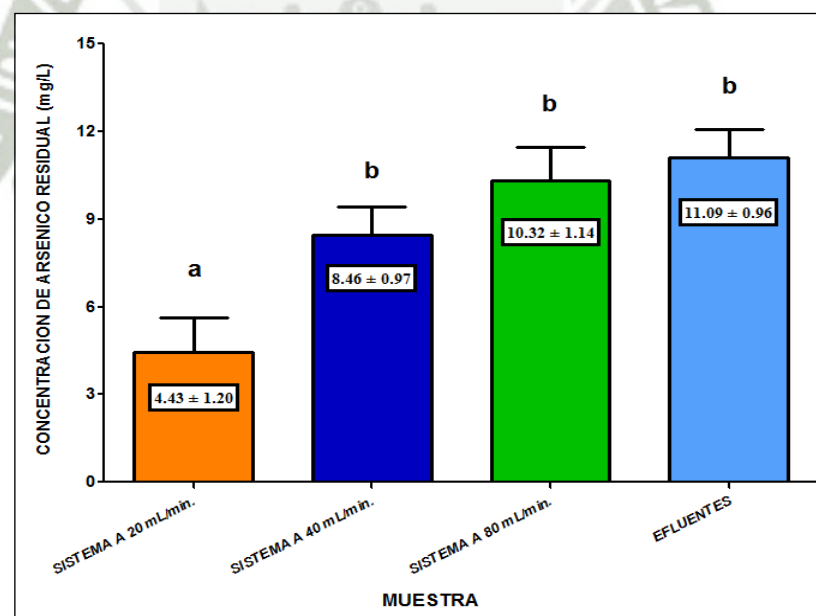


Figura N° 15: Prueba de comparación múltiple para la concentración residual de Arsénico de efluentes industriales del PIRS mediante un sistema de flujo por gravedad con *Chlorella vulgaris*.

La Figura N° 15 muestra la presencia de dos grupos (**a** y **b**), siendo menor la concentración de Arsénico residual de efluentes del PIRS después de ser sometido a

un sistema de flujo por gravedad a la velocidad de flujo de 20 mL/min con 4.43 mg/L (a) en promedio, mientras que la concentración de los efluentes tratados a 40 y 80 mL/min no presentaron diferencias estadísticas con los efluentes sin ser sometidos al sistema de flujo por gravedad (b).

La mayor bioremoción de Arsénico de efluentes del PIRS se presentó a la velocidad de flujo en el sistema de 20 mL/min (Figura N° 15) presentándose una concentración de Arsénico libre residual promedio de 4.43 mg/L, resultando esta velocidad como la más eficiente en la remoción de Arsénico siendo este el menor flujo utilizado a diferencia de lo descrito por (Almaguer Cantú V. et al., 2010) en la evaluación de la bioremoción de Pb^{2+} en una columna empacada con biomasa inmovilizada, en la que señalan que la velocidad de absorción de plomo II fue mayor utilizando un flujo volumétrico de 60 mL/min en comparación al de 40 mL/min por presentar poca resistencia del complejo inmovilizado a un mayor tiempo de contacto entre el biosorbente y el ión metálico y al de 80 mL/min debido a que el tiempo de contacto a este flujo fue insuficiente para establecer un equilibrio entre biosorbente y el ión metálico, según esta premisa se estaría demostrando la resistencia frente a Arsénico por parte de la microalga *Chlorella vulgaris* a mayores tiempos de contacto a este metal, además si se considera un corto tiempo de contacto de la microalga con Arsénico, no se realizará una absorción óptima del metal.

La Remoción porcentual de Arsénico de efluentes del PIRS para las diferentes velocidades de flujo (20, 40 y 80 mL/min), se muestra en la Figura N° 16.

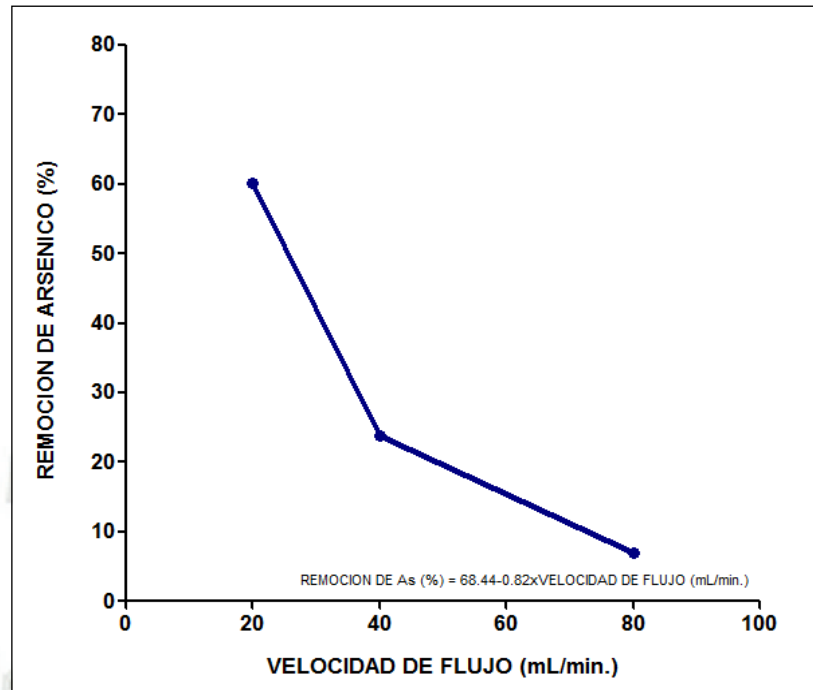


Figura N° 16: Remoción de Arsénico de efluentes industriales del PIRS mediante un Sistema de flujo por gravedad con *Chlorella vulgaris*.

La Figura N° 16 muestra la mayor remoción porcentual de Arsénico a la velocidad de 20 mL/min en el sistema de flujo por gravedad con 60.05%, seguido del 23.72% de remoción obtenido a la velocidad de 40 mL/min en el sistema de flujo por gravedad, mientras que la menor remoción se obtuvo a la velocidad de 80 mL/min. con 6.94% de remoción de Arsénico presente en los efluentes del PIRS. Además el modelo que describe la remoción porcentual de Arsénico indica que si la velocidad de flujo aumenta en 1 mL/min la remoción de Arsénico disminuye en 0.82%.

La mayor remoción de Arsénico de efluentes del PIRS mediante el sistema de flujo por gravedad fue del 60.05% obtenida por la velocidad de flujo de 20 mL/min (Figura N° 16) similar a la obtenida en la evaluación de la captación de cadmio por biomasa libre e inmovilizada de *Nostoc minutum* (cianobacteria filamentosa) (Ferrari, S.G.; et al., 2004), en la que al partir de una concentración inicial de cadmio de 10 mg/L el porcentaje de remoción obtenido fue de 60%, sometiendo a la biomasa a un tratamiento de 80°C en estufa, mientras que la biomasa libre de *Chlorella vulgaris* en la presente investigación no se sometió a ningún tratamiento térmico ni

de inmovilización, solo estuvo expuesta a la variación de la temperatura ambiental como biomasa libre. Se reporta una remoción del 70% de Arsénico en la reducción de los niveles de Arsénico en el agua tratada con TiO_2 (Dessi J. 2006), sin embargo los efectos de la sobre exposición al polvo de TiO_2 causan tirantez y dolor de pecho, tos y dificultad para respirar, el contacto con piel y los ojos puede provocar irritación, efectos que se presentan como perjudiciales para realizar un sistema de remoción mediante esta forma, a pesar de no ser muy distante del porcentaje de remoción de Arsénico mediante esta forma con el obtenido, mediante un tratamiento biológico no asumen riesgos de este grado.

En la Figura N°17 se observa el Sistema de flujo por gravedad.

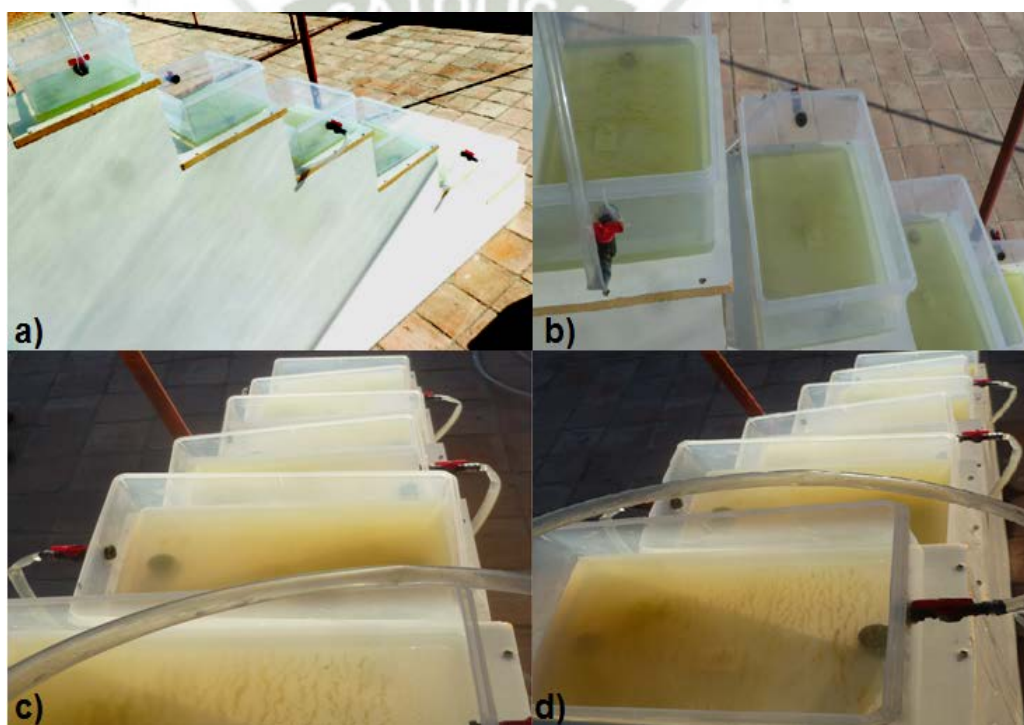


Figura N° 17: Sistema de flujo por gravedad a diferentes velocidades de flujo con cultivo de *Chlorella vulgaris*:

Figura N° 17a) cultivo inicial de 1.5 L de *Chlorella vulgaris* por bandeja, b) efluente del PIRS tratado a 20 mL/min., c) efluente del PIRS tratado a 40 mL/min. d) efluente del PIRS a 80 mL/min.

Se muestra en la Figura N° 18 las muestras del efluente del PIRS antes de ser sometido al sistema de flujo por gravedad.



Figura N° 18: Muestras empacadas en el sistema de flujo por gravedad:

Figura N° 18, se observan las muestras del efluente del PIRS sometidas a 20, 40 y 80 mL/min. y finalmente se observa el cultivo inicial de *Chlorella vulgaris* empacado en el sistema de flujo por gravedad.

3.4 DETERMINACION DE LA TOXICIDAD DE EFLUENTES DEL PIRS TRATADOS MEDIANTE EL SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD A LA VELOCIDAD DE FLUJO DE 20mL/min.

La determinación de la toxicidad se realizó para los efluentes del PIRS que fueron tratados mediante el sistema de flujo por gravedad a la velocidad de flujo de 20 mL/min., debido a que dicho tratamiento fue el que reportó mayor remoción de Arsénico de los efluentes, para la determinación de su toxicidad se evaluó la mortalidad de neonatos de *Daphnia magna* “pulga de agua” así como la determinación de la concentración letal media CL_{50} (Figura N°19).

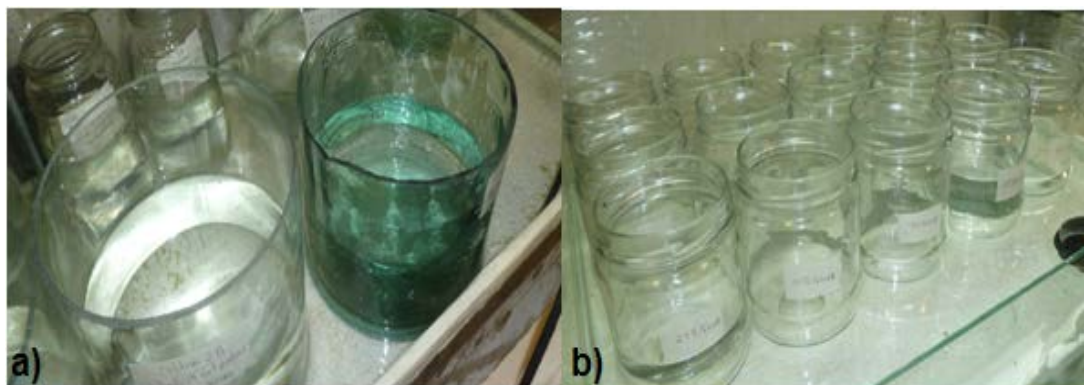


Figura N° 19: Implementación del cultivo de *Daphnia magna* “pulga de agua”, para la evaluación de la toxicidad de efluentes del PIRS tratados mediante el sistema de flujo por gravedad a la velocidad de flujo de 20mL/min.

Se observa en la Figura N°19a) cultivo a temperatura constante de 20°C y separación de pulgas de agua por diferentes tiempos de edad, b) medio de cultivo por triplicado de pulgas de agua para las diluciones del efluente del PIRS tratado a 20 mL/min, para la evaluación de la toxicidad de Arsénico.

Se muestra en la Tabla N° 5 las diluciones realizadas para los efluentes tratados con el sistema de flujo por gravedad a 20 mL/min, las cuales presentaron las concentraciones de Arsénico que se muestran en mg/L, a continuación se observa el número inicial de pulgas de agua por cada unidad de análisis siendo 10 por cada dilución para este bioensayo, se detalla también el número y el porcentaje promedio de pulgas de agua muertas después de 48 hrs. de ser sometidas a las diferentes concentraciones del efluente tratado

TABLA N° 5.
EVALUACION DE LA MORTALIDAD DE NEONATOS
DE *Daphnia magna* “pulga de agua” A 48 hrs. DE SOMETIDOS A EFLUENTE
TRATADO EN UN SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD A 20mL/min.

DILUCION DEL (Efluente)	CONCENTRACION DE ARSENICO (mg/L)	FRECUENCIA INICIAL	FRECUENCIA DE MORTALIDAD	MORTALIDAD (%)
0%	0.00	10	0	0.00
25%	1.11	10	2	20.00
50%	2.22	10	2	20.00
75%	3.32	10	6	60.00
100%	4.43	10	8	80.00

Tabla N°5 muestra una mayor mortalidad para la concentración de 4.43 mg/L de Arsénico con 80%, correspondiente al efluente tratado a la velocidad flujo de 20 mL/min sin dilución alguna, este porcentaje no sería por efecto de arsénico presente en los efluentes solamente ya que estos efluentes presentan otros contaminantes potencialmente biotóxicos generados por las industrias que conforman el PIRS como se muestra en el Anexo 5 (CONAM, 2012).

Los resultados del ensayo de toxicidad de Arsénico residual de efluentes del PIRS tratados en el sistema de flujo por gravedad utilizando como bioindicador neonatos de *Daphnia magna* “pulga de agua” (Tabla N° 5), estaría validado de acuerdo a la norma (INN, 1999), que se determinó la concentración letal que provoca la muerte en el 50% de los individuos a las 48 hrs. de exposición (CL_{50-48h}) y el criterio de aceptabilidad fue la sobrevivencia en los controles mayor a 90%.

En la Figura N° 20 se observan neonatos de *Daphnia magna*.

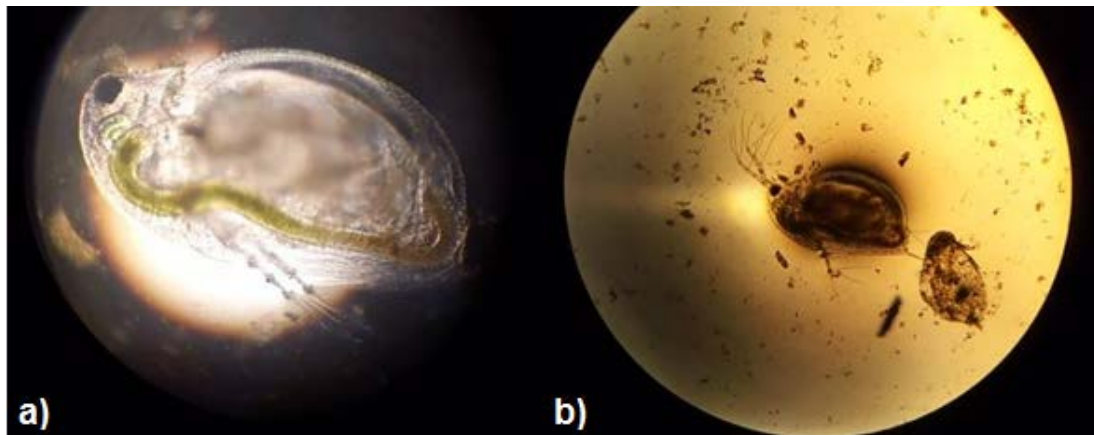


Figura N° 20: Neonatos de *Daphnia magna* “pulga de agua” a 48 hrs. de sometidos a efluente tratado en el sistema de flujo por gravedad a 20mL/min.

Se muestra en la Figura N°20a) *Daphnia* viva a 48 hrs. de sometida a 4.43 mg/L de efluente tratado en el sistema de flujo por gravedad a 20 mL/min identificada en estereoscopio a 50X, b) *Daphnia* viva (centro) y *Daphnia* muerta (derecha) después de 48 hrs. de sometida a 4.43 mg/L de efluente tratado en el sistema de flujo por gravedad a 20mL/min, observadas en estereoscopio a 25X.

La Figura N° 21 muestra la concentración letal media $CL_{50} = 3.25$ mg/L a las 48 hrs. calculada mediante análisis estadístico de Probit, dicho valor indica que con 3.25 mg/L de efluente tratado en el sistema de flujo por gravedad se obtiene el 50% de mortalidad de neonatos de *Daphnia magna*, se muestra también la mortalidad de neonatos de *Daphnia magna* por cada concentración de efluente tratado, así mismo el modelo matemático de la distribución Probit detallado en la figura, permitirá realizar pronósticos para determinar la concentración para cualquier porcentaje de mortalidad.

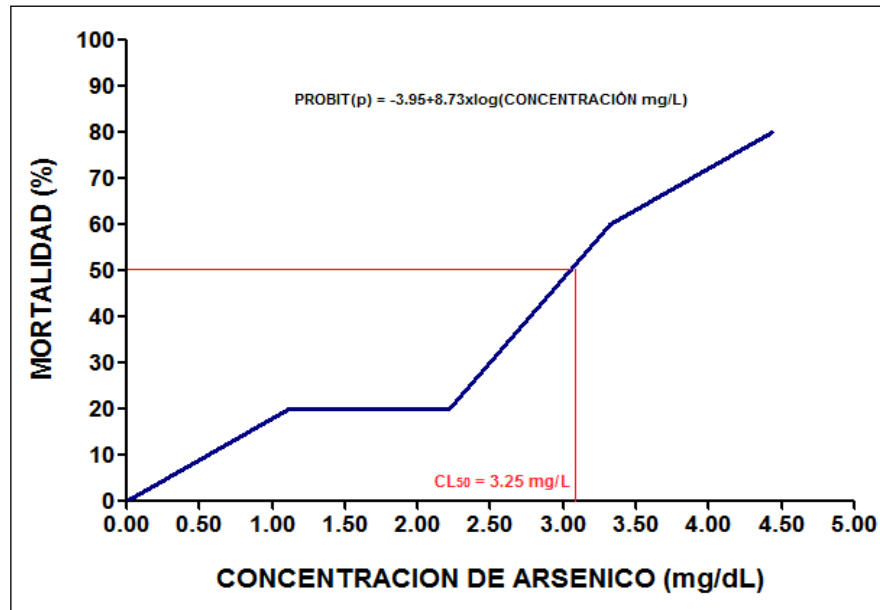


Figura N° 21: Determinación de la Concentración Letal Media cl_{50} de neonatos de *Daphnia magna* “pulga de agua” a 48 hrs. de sometidos a efluente tratado en un sistema de flujo por gravedad a 20ml/min.

La CL_{50} (3.25mg/L) determinada mediante un modelo PROBIT se presenta mucho mayor que la toxicidad aguda determinada en la evaluación de efecto del arseniato en algas, *Daphnia* y pez mosquito, (Jureswicz y Buikema, 1980) en la que CL_{50-24h} del Arsénico sobre *Daphnia pulex* y *Daphnia magna* fluctúa entre 1.0 y 5.2 $\mu\text{g/L}$, y también que la reportada en la evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, zinc y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Gaete H. y Chávez C., 2008), en que la toxicidad del Arsénico fue en forma de As_2O_3 resultando una CL_{50-24h} de 6.1 $\mu\text{g/L}$. Estos resultados demostrarían la menor toxicidad de los efluentes del PIRS tratados mediante el sistema de flujo por gravedad a 20 mL/min, ya que se presenta un 50% de mortalidad con una mayor concentración de Arsénico residual, esto se explicaría por la presencia de Arsénico en formas orgánicas dominantes menos tóxicas, como el ácido dimetilarsínico {DMAA, $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$ } y el ácido monometilarsínico {MMAA, $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$ } por efecto de la *Chlorella vulgaris*, donde el Arsénico está presente en ambos casos como Arsénico III y Arsénico V (Torralba, 1996),

CONCLUSIONES

PRIMERA: Se aisló la microalga *Chlorella vulgaris* de efluentes residuales hasta la obtención de su cultivo puro mediante diluciones sucesivas hasta la dilución de 1:100, evitando su contaminación con la aplicación de 25 µg/mL de ampicilina y 35 µg/mL de cloranfenicol.

SEGUNDA: El crecimiento en el número de células de *Chlorella vulgaris* fue en incremento, presentándose un crecimiento promedio máximo de 71333.34 organismos/mL en la cuarta evaluación con la aplicación de 6.4 mg/L de Arsénico III y un crecimiento promedio hasta los 20 días de 47796.67 organismos/mL, a diferencia del grupo control que presentó el menor crecimiento promedio con 34720.00 organismos/mL a los 20 días de evaluación, demostrando la resistencia a Arsénico por parte de la microalga, mediada por una alta capacidad de bioabsorción del metal y su transformación a formas orgánicas menos tóxicas.

TERCERA: Se diseñó e implementó un sistema de flujo, mediante contenedores con 9.5° de inclinación interconectados uno a continuación de otro y controlado por reguladores de flujo, el cual fue empacado con 1.5L de cultivo puro de *Chlorella vulgaris* por contenedor, donde la biomasa libre de la microalga entró en contacto con el Arsénico presente en los efluentes del PIRS, la circulación de los efluentes en el sistema fue solamente por gravedad sin necesidad de una bomba que los impulse.

CUARTA: La capacidad de absorción de Arsénico por *Chlorella vulgaris* en efluentes del PIRS, fue medida por un indicador de biomasa como es la concentración de Clorofila A, resultando en una reducción de 153.85 mg/m³ presente en el cultivo puro de *Chlorella vulgaris* a 81.52 mg/m³ después de sometida a 20 mL/min en el sistema de flujo por gravedad, velocidad de flujo a la que se obtuvo también la menor concentración de Arsénico residual de efluentes del PIRS con 4.43 mg/L, representando una remoción del 60.05% Arsénico.

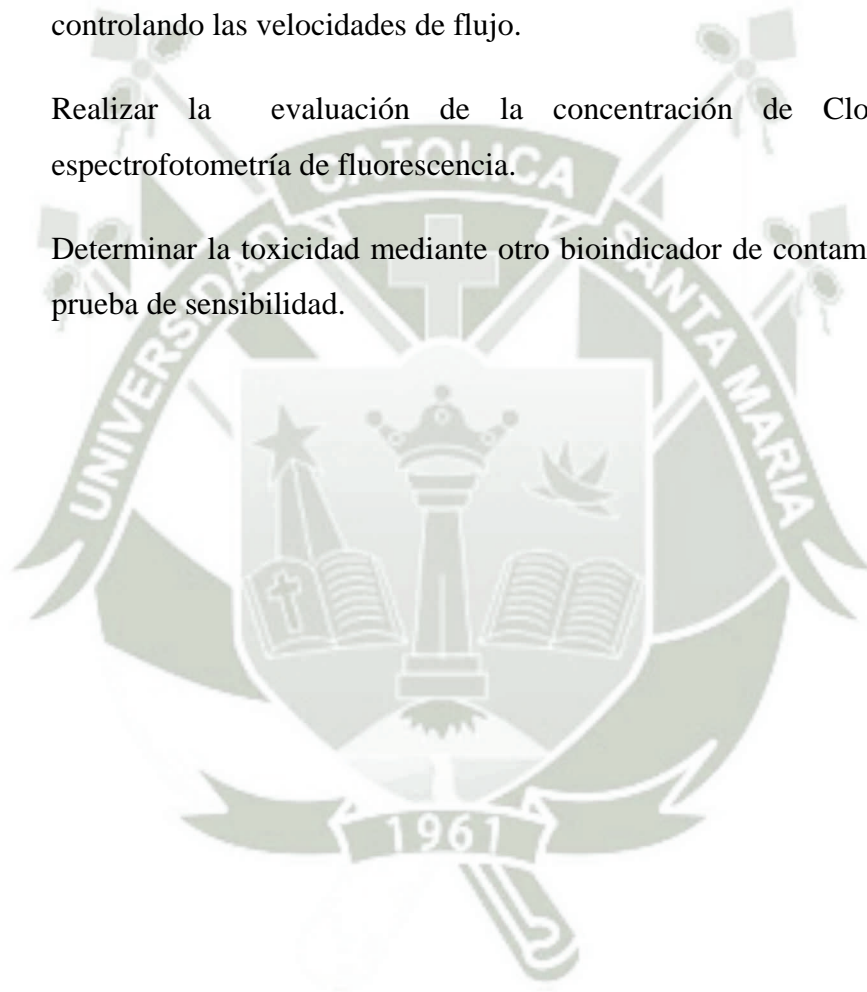
QUINTA: La mayor mortalidad fue reportada para la concentración de 4.43 mg/L de Arsénico, correspondiente al efluente tratado a la velocidad de flujo de 20 mL/min en

el sistema de flujo por gravedad sin dilución alguna, con 80% de neonatos de *Daphnia magna* a 48 hrs. de evaluación de la toxicidad, mientras que el 50% de mortalidad (CL_{50}) obtenida mediante el análisis de PROBIT fue de 3.25 mg/L a las 48 hrs. de evaluación, el ensayo de toxicidad estaría validado por cumplir el criterio de aceptabilidad de sobrevivencia en los controles mayor a 90%, presentándose en el ensayo 100% de sobrevivencia de neonatos de *Daphnia magna* a 48 hrs. en los controles.

SEXTA: La remoción de Arsénico por *Chlorella vulgaris* resultó efectiva, evidenciada por un mayor crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de Arsénico III en comparación con el cultivo puro de *Chlorella vulgaris*. La capacidad de remoción Arsénico de efluentes del Parque Industrial de Río Seco (PIRS), mediante el sistema de flujo por gravedad fue mayor a la velocidad de flujo de 20 mL/min con una remoción del 60.05%, mostrando una reducción leve de biomasa evidenciada por la disminución en la concentración de Clorofila A. Los efluentes tratados a 20 mL/min en el sistema de flujo por gravedad producen un 50% de mortalidad de neonatos de *Daphnia magna* a 48 hrs. con 3.25 mg/L, concentración menos tóxica en comparación a las reportadas por presentarse una transformación de Arsénico en formas orgánicas menos tóxicas.

RECOMENDACIONES

- Probar la remoción de Arsénico mediante biomasa de *Chlorella vulgaris* inmovilizada en diferentes materiales, empacada en el sistema de flujo por gravedad.
- Ensayar la remoción de otros metales en el sistema de flujo propuesto, controlando las velocidades de flujo.
- Realizar la evaluación de la concentración de Clorofila A en espectrofotometría de fluorescencia.
- Determinar la toxicidad mediante otro bioindicador de contaminación previa prueba de sensibilidad.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Abalde J., A. Cid, J. P. Fidalgo, E. Torres y C. Herrero. (1995). Microalgas: Cultivos y Aplicaciones. Universidad La Coruña.
- 2) Abdul Rehman Y A.R. Shakoori. La tolerancia y la absorción de cadmio y níquel por *Chlorella* sp., aislado de efluentes de tenería. *Pakistan J. Zool.*, vol. 36(4), pp. 327-331, 2004.
- 3) Aksu, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry*, 40, 997– 1026. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.04.008. 2005.
- 4) Almaguer Cantú V. et al. Bioadsorción de Pb^{2+} en una columna empacada con biomasa inmovilizada *Ciencia-UANL./* vol. XIII, No. 2, Abril - Junio 2010.
- 5) APHA. 1998, Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20th edition.
- 6) Azeez P.A. y Bonerjee D.K. (1987). Influence of light on chlorophyl a content of blue-reen algal treated with heavy metals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 1062-1069.
- 7) Barsanti, Laura y Gualtieri, Paolo. (2006). *Algae. Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology.* Taylor & Francis group. 301 páginas.
- 8) Bencko, v. y Symon, K. 1977. “Health aspects of burning coal with a high arsenic content”. *Environ. Res.* 13: 378-85.
- 9) Crecelius, E.A.; Johnson, C.J. y Hofer, G.C. 1974. “Contamination of soils near a copper smelter by arsenic, antimony and lead”. *Water Air Soil Pollut.* 3. 337-42.
- 10) Compañía de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Agua-Teste de toxicidade com *D. similis* Claus 1876, (Cladóceras, Crustácea), Metodo de essaio. L5.018. Agosto 1991. CETESB.

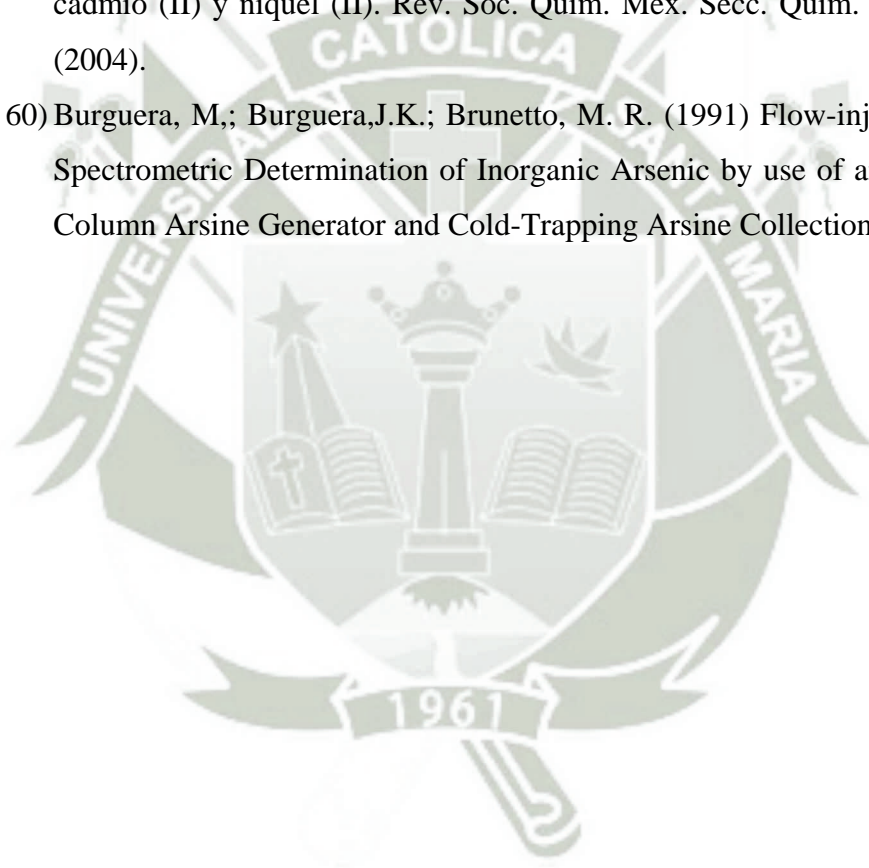
- 11) CONAM. Informe del plan de adecuación ambiental PIRS Arequipa. Secretaría Ejecutiva Regional del Ambiente Arequipa-Moquegua-Tacna. 2012.
- 12) Dermont G, Bergeron M, Mercier G. Soil washing for metal removal: A review of physical/chemical technologies and field applications. *Journal of Hazardous Materials*. 2008;152:1-31.
- 13) Dessi J. Reducción de los niveles de arsénico en el agua tratada con TiO_2 . Boletín informativo. QuimiNet. Santa Cruz, Argentina. 2006.
- 14) Díaz, C. Pica, Y. Ronco, A. (2006). Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*. The International development Research Centre.
- 15) Eccles H. Treatment of metal-contaminated wastes: why select a biological process? *Trends in Biotechnology*. 1999;17:462-465.
- 16) Fernández L. y Novillo A. (1996). "Toxicity and bioaccumulation of cadmium in *Olithodiscus luteus* (Raphidophyceae)". *Wat. Rev.* 30 (1):57-62.
- 17) Ferrari, S.G.; et al. Captación de cadmio por biomasa libre o inmovilizada de *Nostoc minutum* (cianobacteria filamentosa). *Acta Toxicol. Argent.* (2004) 12 (1):19-22.
- 18) Fujita, T., et al. Proc. of the XIX International Mineral Processing Congress, Vol.4, SME, Littleton (New Hampshire), 1995.
- 19) Furr, A.K.; Kelly, W.C.; Bache, C.A.; Gutenmann, W.H. y Lisk, D.J. 1976. "Multi-elemental uptake by vegetables and millet grown in pots on fly ash amended soil". *J. Agric. Fd. Chem.* 24: 885-888.
- 20) Gadd, G.M. y White, C. *TIB Tech.*, 11, 1993: 353-359.
- 21) Gaete H. y Chávez C. Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1874) (Cladocera, Crustacea). *Limnetica*, 27 (1): 1-10. (2008).
- 22) González B., E. Buitargo y K. Frontado. (1999). Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura.
- 23) Haan, F.A.M. y Riemsdijk, W.H. 1978. "Behaviour of inorganic contaminants in soil. Contaminated soil". Martinus Nijhoff Publishers. 19-32.

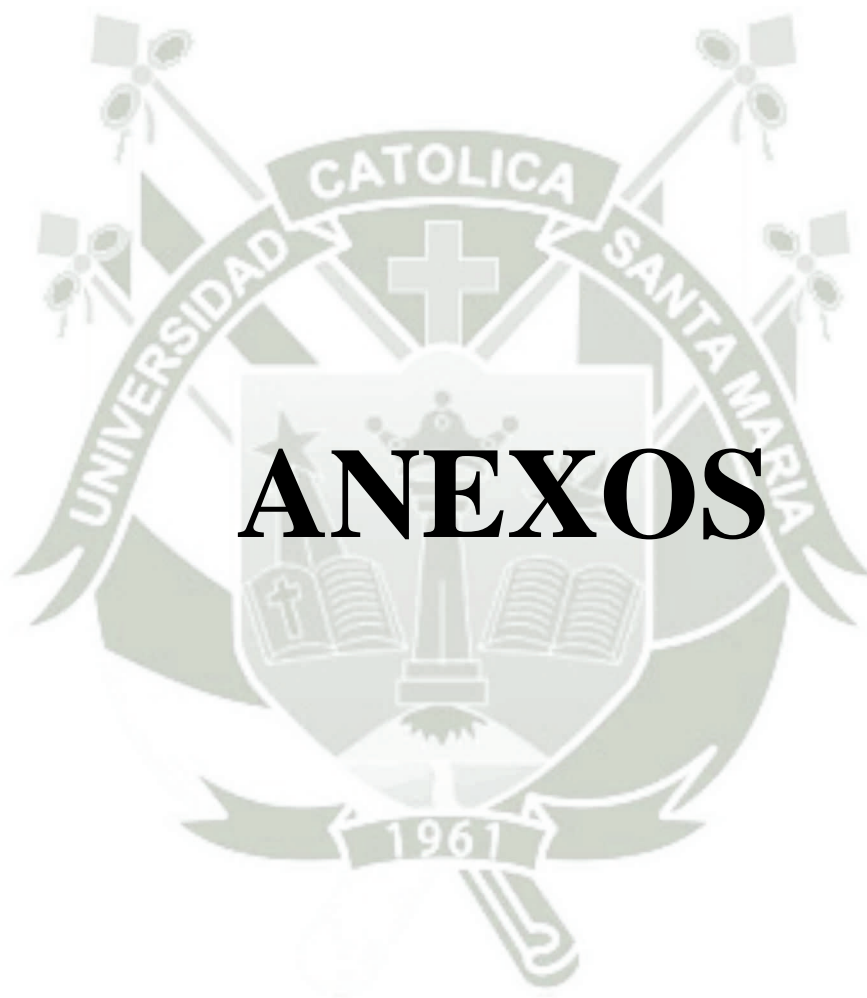
- 24) INN. 1999. Bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera). Norma Chilena NCh2083/1999. Instituto Nacional de Normalización, Chile. 10 pp.
- 25) Jervis, R.E. y Tiefenbach, B. 1979. "Arsenic accumulation in gold smelter workers and nearby residents". In: Nuclear Activation Techniques in the Life Sciences 1978, International Atomic Energy Agency, Vienna. 627-42.
- 26) Jong, T.; Parry DL. Removal of sulphate and heavy metals by sulphate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Research*. 2003;37:3379-3389.
- 27) Junta de Castilla y León, 2005 Arsenic removal from water/wastewater using adsorbents A critical review. Environmental Chemistry Division, Industrial Toxicology Research Centre.
- 28) Jureswicz, S. y A. L. Buikema. 1980. Effects of arsenate on algae, daphnia and mosquito fish, Virginia. *J. Sci.*, 31:124. Cited in EPA. 1985.
- 29) Kanno, Toshihiro. Uyama, Kazie. (2005). *Chlorella vulgaris*: The Powerful Japanese Medicinal Green Algae as a Biological Response Modifier. Publicado por Woodland Publishing. 63 páginas.
- 30) Khan FI, Husain T, Hejazi R. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management*. 2004;71:95-122.
- 31) Konishi, F. *et al.*, Protective effect of an acidic glycoprotein obtained from culture of *Chlorella vulgaris* sp against myelo-suppression by 5-fluorouracil cancer immunol immunolother, 46:268-274. 1996.
- 32) Lazo R. Efecto de la fitoextracción de As, Cr, Cd, Cu, Hg y Pb en la supervivencia, crecimiento de plántulas de *Chenopodium murale*, *Baccharis salicifolia*, *Eleocharis montevidensis* y *Tessaria integrifolia* y su relación con la respuesta fisiológica y proteómica. UNAS. Arequipa. 2009.
- 33) Lee R. E. (1995) Phycology. Cambridge, University Press, USA.
- 34) Lepp, N.W.(ed.). 1981. "Effect of heavy metals pollution on plants. Vol. 1. Effects of trace metal on plant function". Applied Science Publishers. London and New Jersey.

- 35) Levander, O. 1977. "Nutritional factors in relation to heavy metal toxicants". Federation Proceedings. 36, 5: 1683-87.
- 36) Lillo, J. (2003). Peligros geoquímicos: arsénico de origen natural en las aguas. Grupo de Estudios de Minería y Medio Ambiente. La Serena, Chile.
- 37) Madigan, M. Martinko, J. Parker, J. (2002). Cianobacterias. Biología de los Microorganismos. Pearson, Prentice Hall. Madrid –España pp 418-423.
- 38) Marcano, *et al.* Evaluación de los cambios ultraestructurales de adaptación de la microalga *Scenedesmus* sp al estrés inducido por cadmio y vanadio (Cd y V) *Acta Microscópica* Vol. 19, No. 3, 2010, pp. 214- 220.
- 39) Marin N., Morales F., Lodeiros C. y Tamigneaux, E. (1998). "Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities". *J Appl Phycol* 10 (4):405-411.
- 40) Montes J., y Pulido M. Obtención de protocolos para el aislamiento, cultivo y extracción de ADN de *Chlorella vulgaris* Beyerinck. *Astrolabio* vol.11.2 art. 04. 2012. Colombia
- 41) Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF. An evaluation of technologies for the heavy metal remediation of dredged sediments. *Journal of Hazardous Materials*. 2001;85:145-163.
- 42) N.A.S. 1977. "Medical and biologic effects of environmental pollutants: Arsenic". Washington, D.C., National Academy of Sciences.
- 43) O'toole, J.J.; Clark, R.G.; Malaby, K.L. y Tranger, D.L. 1971. "Environmental trace element survey at a heavy metals refining site". ANS Meeting, University of Missouri, Columbia.
- 44) Ragaini, R.C.; Ralston, H.R. y Roberts, N.. 1977. "Environmental trace metal contamination in Kellogg, Idaho, near a lead smelting complex". *Environ. Sci. Technol.* 11: 773-81.
- 45) Rai L.C. y Mallick N. Remoción y evaluación de la toxicidad de Cu y Fe mediante células libres e inmovilizadas de *Anabaena doliolum* y *Chlorella vulgaris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8, India 1992. 110-114.

- 46) Rosehart, R.G. y Lee, J.Y. 1973. "The effects of arsenic on the growth of white spruce seedlings". *Water Air Soil Pollut.* 2: 439-43.
- 47) Sánchez T. E. et al. Estudio cinético e isotermas de adsorción de Ni (II) y Zn (II) utilizando biomasa del alga *Chlorella sp.* inmovilizada. *Ciencia UANL*, abril-junio, año/vol. XI, número 002 Universidad Autónoma de Nuevo León Monterrey, México 2003 pp. 168-17.
- 48) Serrano B., et al. Efecto del hierro en el crecimiento y acumulación de lípidos en la microalga colombiana *Chlorella Vulgaris* LAUN 0019. *ITECKNE* Vol. 8 Número 1 • ISSN 1692 - 1798 • Colombia Julio 2011 • 15 – 22.
- 49) Swaine, D.J. 1977. "Trace elements in coal". *Trace Subst. Environ. Hlth.* 11: 539-50.
- 50) Temple, P.J.; Linzon, S.N. y Chai, B.L. 1977. "Contamination of vegetation and soil by arsenic emissions from secondary lead smelters". *Environ. Pollut.* 12: 311-20.
- 51) Torralba, M. (1996). Mejoras al sistema de Generación de Hidruros-Absorción Atómica para la Determinación de Arsénico Total en Materiales Biológicos. Determinación Simultánea de sus Especies Tóxicas Mediante Procedimientos de Calibración Multivariante.
- 52) Twidwell, L.G.; McCloskey, J.M.; Miranda, P. y Gale, M., 1999. Technologies and potential technologies for removing arsenic from process and mine wastewater. *Proceedings Global Symposium on Recycling, Waste Treatment and Clean Technology*, San Sebastián, Spain. Gaballah, I., Hager, J., Solozábal, R. (Eds.). TMS, Warrendale, PA, pp. 1715-1726.
- 53) Valiente, V. "Compendio de Medios de Cultivos, Soluciones y Extractos para Microalgas y Cianobacterias". Dpto. de Estudios sobre Contaminación Ambiental. CNIC. 1ra Edición. Cuba 1995.
- 54) Vijayaraghavan K, Yun Y-sang. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances.* 2008;26:266 - 291.
- 55) Volesky, B. *Biosorption of Heavy Metals*, CRC Press, Boca Ratón (Florida), 1990.
- 56) Wauchope, R.D. 1983. "Uptake, translocation and phytotoxicity of arsenic in plants". pp 348-374. In: *Arsenic: Industrial, Biomedical, Environmental*

- Perspectives (Lederer y Fensterheim (ed.)). Arsenic Symposium, Gaithersburg, Maryland. Van Nostrand Reinhold Company. New York, N.Y.
- 57) World Health Organization. 1993."Arsenic". Environmental Health Criteria 18, Geneva. Finland.
- 58) Xianhai Z. et al. Comparative physicochemical analysis of suspended and immobilized cultivation of *Chlorella* sp. J Chem Technol Biotechnol. USA277:270–276. 2012.
- 59) Marroquín Guerra, S.G. y M.T. Garza González. Evaluación de la contribución de los grupos funcionales carboxílicos, aminos y tioles de la biomasa de *Chlorella* sp. y *Acremonium* sp. en la sorción de cromo (VI) cadmio (II) y níquel (II). Rev. Soc. Quim. Mex. Secc. Quim. Amb. 1:53-56 (2004).
- 60) Burguera, M.; Burguera, J.K.; Brunetto, M. R. (1991) Flow-injection Atomic Spectrometric Determination of Inorganic Arsenic by use of an Aluminium-Column Arsine Generator and Cold-Trapping Arsine Collection: 105-128.





ANEXOS

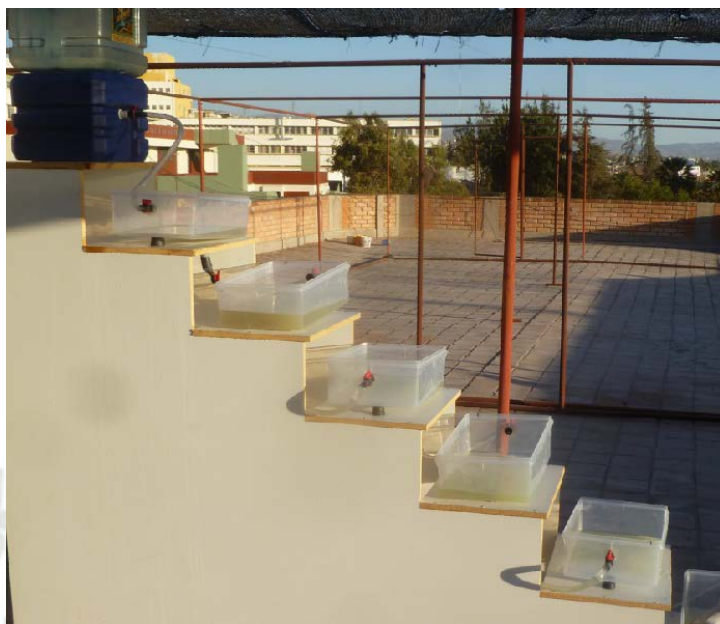




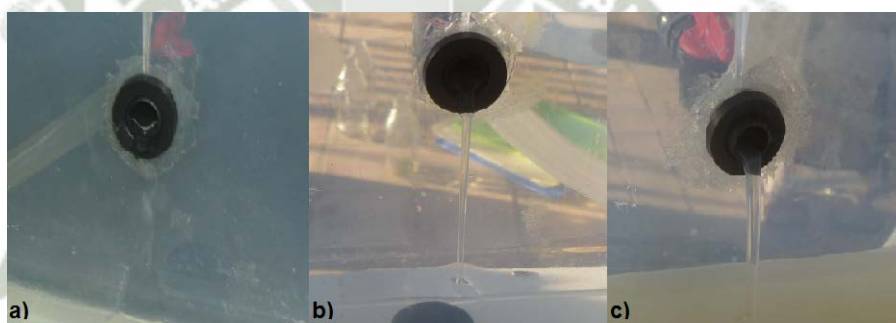
Cultivo de *Chlorella vulgaris* bajo condiciones de temperatura y aireación constantes



Adición Arsénico III en forma de Na_2HAsO_3 , en el cultivo de *Chlorella vulgaris*.



Sistema de flujo por gravedad con cultivo de *Chlorella vulgaris*

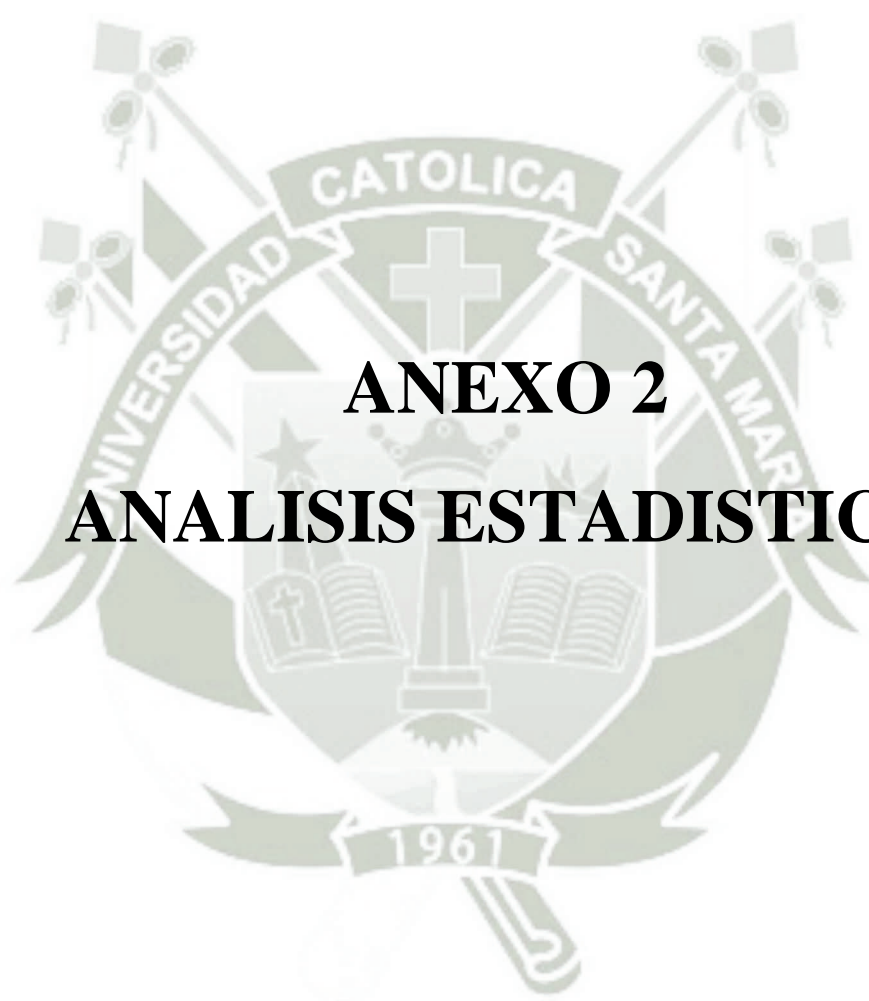


Velocidades del sistema de flujo por gravedad con cultivo de *Chlorella vulgaris*.

- a) velocidad de flujo de 20 mL/min,
- b) velocidad de flujo de 40 mL/min,
- c) velocidad de flujo de 80 mL/min



Evaluación de clorofila A de *Chlorella vulgaris* mediante espectrofotometría de las muestras empacadas en el sistema de flujo por gravedad



ANEXO 2

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

**RECUENTOS PROMEDIO DE *Chlorella vulgaris* EN DIFERENTES
TIEMPOS DE EVALUACION**

	TRATAMIENTOS	Media	Desv. ttp.
evaluacion1	C	27413.3333	14633.36826
	T1	28026.6667	7605.92050
	T2	23813.3333	5582.52512
	T3	24026.6667	8148.01735
evaluacion2	C	30933.3333	5614.76150
	T1	43466.6667	7749.46364
	T2	41173.3333	8953.52147
	T3	41866.6667	10025.07789
evaluacion3	C	34600.0000	12499.65120
	T1	46386.6667	10649.36931
	T2	45813.3333	7510.57565
	T3	53960.0000	9829.22988
evaluacion4	C	45933.3333	7456.14020
	T1	55933.3333	9612.31432
	T2	53680.0000	5833.09180
	T3	71333.3333	8797.18743

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS PARA RECuento DE *Chlorella vulgaris*.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
factor1	11889827400.000	3	3963275800.000	100.991	.000
factor1 * tratamientos	1713733933.334	9	190414881.482	4.852	.000
Error(factor1)	2354635466.667	60	39243924.444		

ANOVA DE PROMEDIOS DEL RECuento DE *Chlorella vulgaris* ALOS 20 DIAS DE CULTIVO

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media Cuadrática	F	Significación
Intersección	167514408600.000	1	167514408600.000	785.586	.000
tratamientos	2142703133.334	3	714234377.778	3.350	.040
Error	4264697866.667	20	213234893.333		

PRUEBA DE TUKEY PARA EL RECUENTO DE *Chlorella vulgaris*.

TRATAMIENTOS	Subconjunto	
C	34720.0000	
T2	41120.0000	41120.0000
T1	43453.3333	43453.3333
T3		47796.6667
Significación	.196	.410

**PROMEDIOS Y DESVIACIONES ESTANDAR
DE LAS CONCENTRACIONES DE CLOROFILA A POR
VELOCIDAD DEL SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD**

	Media	Desviación típica
CULTIVO DE <i>C. vulgaris</i>	153.8500	6.44394
SISTEMA A 20 mL/min.	81.5200	9.15638
SISTEMA A 40 mL/min.	40.1800	2.07885
SISTEMA A 80 mL/min.	36.7400	4.51866
Total	78.0725	49.53897

**ANOVA DE LA CONCENTRACION DE CLOROFILA A DE
LAS VELOCIDADES DE FLUJO DEL SISTEMA POR GRAVEDAD**

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	26694.996	3	8898.332	237.125	.000
Intra-grupos	300.207	8	37.526		
Total	26995.203	11			

**PRUEBA DE TUKEY DE LA CONCENTRACION DE CLOROFILA A DE
LAS VELOCIDADES DE FLUJO DEL SISTEMA POR GRAVEDAD**

	Subconjunto para alfa = .05		
SISTEMA A 80 mL/min.	36.7400		
SISTEMA A 40 mL/min.	40.1800		
SISTEMA A 20 mL/min.		81.5200	
CULTIVO DE <i>C. vulgaris</i>			153.8500
Sig.	.899	1.000	1.000

**PROMEDIOS Y DESVIACIONES ESTANDAR
DE LAS CONCENTRACIONES RESIDUALES DE As POR
VELOCIDAD DEL SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD**

	Media	Desviación típica
EFLUENTES	11.0900	.96504
20mL/min.	4.4300	1.20503
40mL/min.	8.4600	.97632
80mL/min.	10.3200	1.14713
Total	8.5750	2.84443

**ANOVA DE LA CONCENTRACION RESIDUAL DE As DE
LAS VELOCIDADES DE FLUJO DEL SISTEMA POR GRAVEDAD**

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	79.694	3	26.565	22.839	.000
Intra-grupos	9.305	8	1.163		
Total	88.999	11			

**PRUEBA DE TUKEY DE LA CONCENTRACION RESIDUAL DE As DE
LAS VELOCIDADES DE FLUJO DEL SISTEMA POR GRAVEDAD**

	Subconjunto para alfa = .05	
20mL	4.4300	
40mL		8.4600
80mL		10.3200
EFLUENTES		11.0900

ANALISIS DE PROBIT PARA NEONATOS DE Daphnia magna PARA As

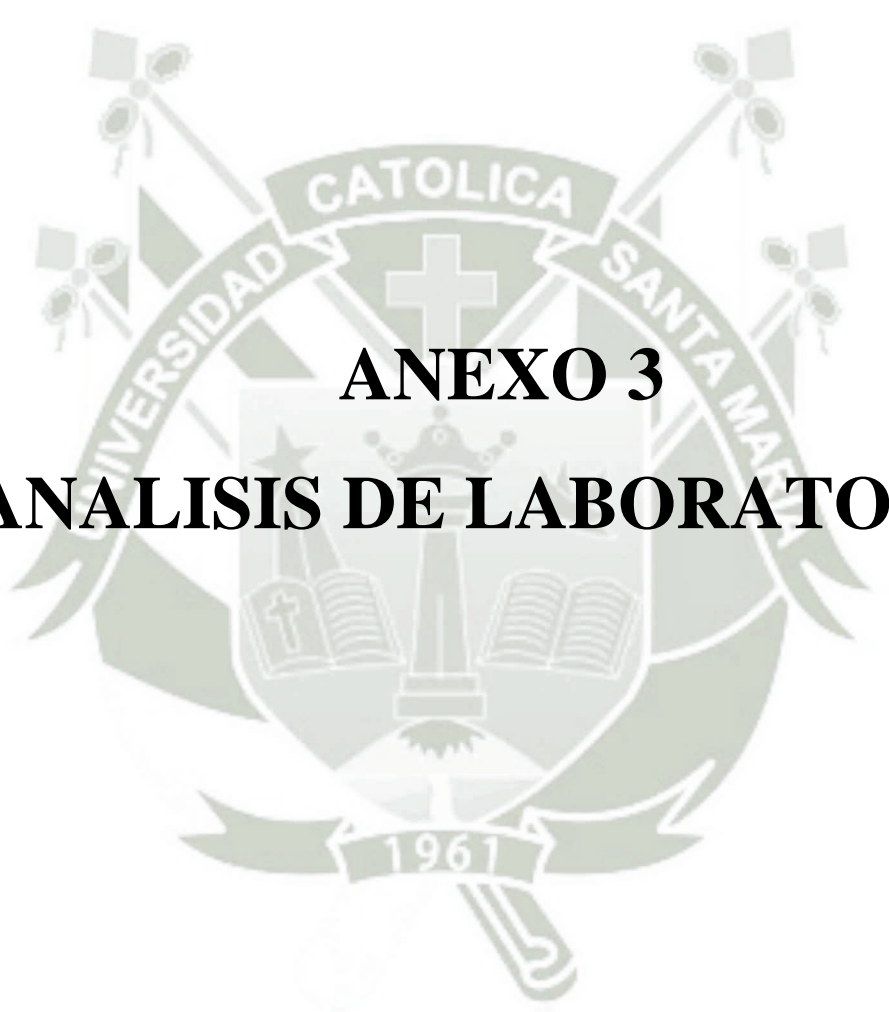
ESTIMACIONES DE LOS PARÁMETROS MODELO PROBIT

	Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.
PROBIT(a)	DOSIS	8.732	3.634	2.023	.043
	Intersección	-3.951	2.116	-1.871	.061

Modelo PROBIT: $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)


ESTIMACION Y LIMITES DE CONFIANZA DE LA CL₅₀

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para DOSIS			Límites de confianza al 95% para log(DOSIS)(a)		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT .010	1.668	.000	2.567	.222	-10.790	.409
.020	1.816	.000	2.691	.259	-9.593	.430
.030	1.918	.000	2.775	.283	-8.833	.443
.040	1.997	.000	2.840	.300	-8.262	.453
.050	2.065	.000	2.895	.315	-7.798	.462
.060	2.124	.000	2.944	.327	-7.403	.469
.070	2.177	.000	2.988	.338	-7.056	.475
.080	2.226	.000	3.028	.347	-6.746	.481
.090	2.271	.000	3.065	.356	-6.464	.486
.100	2.314	.000	3.101	.364	-6.205	.491
.150	2.498	.000	3.258	.398	-5.131	.513
.200	2.656	.000	3.400	.424	-4.279	.532
.250	2.798	.000	3.541	.447	-3.550	.549
.300	2.933	.001	3.689	.467	-2.898	.567
.350	3.064	.005	3.860	.486	-2.296	.587
.400	3.093	.019	4.072	.490	-1.730	.610
.450	3.123	.065	4.370	.494	-1.190	.640
.500 (CL ₅₀)	3.251	.211	4.871	.512	-.676	.688
.550	3.596	.627	5.972	.556	-.203	.776
.600	3.742	1.475	9.438	.573	.169	.975
.650	3.900	2.363	22.904	.591	.373	1.360
.700	4.074	2.928	77.280	.610	.467	1.888
.750	4.270	3.289	322.187	.630	.517	2.508
.800	4.500	3.561	1660.655	.653	.552	3.220
.850	4.783	3.802	11536.532	.680	.580	4.062
.900	5.165	4.055	134611.773	.713	.608	5.129
.910	5.261	4.112	244077.727	.721	.614	5.388
.920	5.369	4.172	466139.191	.730	.620	5.669
.930	5.489	4.238	949952.407	.739	.627	5.978
.940	5.626	4.309	2104983.290	.750	.634	6.323
.950	5.787	4.390	5219120.024	.762	.642	6.718
.960	5.983	4.484	15176996.934	.777	.652	7.181
.970	6.231	4.599	56421074.223	.795	.663	7.751
.980	6.578	4.751	323546535.857	.818	.677	8.510
.990	7.165	4.993	5083450118.849	.855	.698	9.706



ANEXO 3
ANÁLISIS DE LABORATORIO

ANEXO 3-A: ANALISIS DE LABORATORIO PARA EFLUENTES DEL PIRS



LABORATORIOS de ENSAYOS

ICMA-PERU S.A.C.

INFORME DE ENSAYO FISICO QUIMICO N° 02-0571/13

I. Datos del Solicitante	
Razón Social :	GRACE ROSAS LA TORRE
Dirección :	Los Laureles O-4 José Luis Bustamante y Rivero
II. Datos del Servicio	
N° de Solicitud de Servicio :	02-0733/Agu/13
Fecha de Ingreso :	28-Setiembre-2013
Servicio Solicitado :	ANÁLISIS FISICO QUIMICO
III. Nombre del Producto	
:	AGUA DE EFLUENTE
IV. Datos de la Muestra	
Presentación :	Botella de vidrio
Tipo de Sistema :	1/ Prototipo
V. Aspectos Técnicos del Muestreo	
Muestreado por :	El Solicitante
Fecha de Muestreo :	06-09-2013
Detalle de la Muestra :	Agua de Efluente (Parque Industrial Río Seco)
Tamaño de la Muestra :	Una (01) muestra de 250 mL
Identificación de la Muestra para Ensayos en Laboratorio :	02-0571/13
VI. Fecha de ensayo	
:	28-09-2013

VII. RESULTADOS


DETALLE DE LA MUESTRA

CÓDIGO	PRODUCTO	Hora Muestreo
V-1	Agua de Efluente (Parque Industrial Río Seco)	12:00

ANÁLISIS FISICO QUIMICO

REQUISITOS	VALOR OBTENIDO		
	Método de Referencia	Resultado	Unidad
Análisis (As)	EPA 200.7 Revisión 4.4	11.726 33/11.54	mg/L

Arequipa, 02 de Octubre del 2013




Óscar Corzo de la Cruz
Coordinador del Laboratorio
COP 500

Este documento es válido sólo en su totalidad.
 Prohíbese su uso parcial o en forma de extracto, sin la autorización expresa de ICMA S.A.C.
 Cualquier alteración o modificación en el contenido de este informe es responsabilidad del usuario.
 La validez de este documento depende de la correcta aplicación de los métodos de análisis y de la calidad de los reactivos y equipos utilizados en el laboratorio.
 El presente informe de análisis es válido por 90 días calendario, contados a partir de la fecha de emisión.
 La gestión de este informe debe realizarse en el área de atención al cliente de ICMA.

UIC Magisterial 18 Depto-B-6 Yaghuayán / Arequipa / Teléfono: (054) 259820
 Teléfono: (054) 259327 / E-mail: icma@icma.pe / www.icma.pe
 Cel. (054)-660311055 / 955357084

Página 1 de 1

ANEXO 3-B: ANALISIS DE LABORATORIO PARA EFLUENTES DEL PIRS TARTADOS A 20mL/min. EN EL SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD



LABORATORIOS de ENSAYOS

ICMA-PERU S.A.C.

INFORME DE ENSAYO FISICO QUIMICO N° 02-0572/13

I. Datos del Solicitante	
Razón Social	: GRACE ROSAS LA TORRE
Dirección	: Los Laureles C-4 José Luis Bustamante y Rivero
II. Datos del Servicio	
N° de Solicitud de Servicio	: 02-0734/Agu/13
Fecha de Ingreso	: 28-Setiembre-2013
Servicio Solicitado	: ANALISIS FISICO QUIMICO
III. Nombre del Producto	: AGUA TRATADA DE EFLUENTE
IV. Datos de la Muestra	
Presentación	: Botella de vidrio
Tipo de Sistema	: 1/ Prototipo
V. Aspectos Técnicos del Muestreo	
Muestreado por	: El Solicitante
Fecha de Muestreo	: 14-09-2013
Detalle de la Muestra	: Agua Tratada de Efluente (20 ml x 1 minuto) Laboratorio
Tamaño de la Muestra	: Una (01) muestra de 250 mL.
Identificación de la Muestra para Ensayos en Laboratorio	: 02-0572/13
VI. Fecha de ensayo	: 28-09-2013

VI. RESULTADOS


DETALLE DE LA MUESTRA

CODIGO	PRODUCTO	Hora Muestreo
V-I	Agua Tratada de Efluente (20 ml x 1 minuto) Laboratorio	14:00

ANALISIS FISICO QUIMICO

REQUISITOS	VALOR OBTENIDO		
	Método de Referencia	Resultado	Unidad
Aménico (As)	EPA 200.7 Revisión 4.4	3.79 5.82 3.48	mg/L

Arequipa, 02 de Octubre del 2013




Coordinadora de Laboratorio
CBP #50

Este documento es válido sólo en original.
 Publicado y autorizado para su uso con fines académicos y de investigación.
 Los resultados obtenidos en este laboratorio están sujetos a las condiciones de muestreo y análisis.
 Los resultados de los análisis de laboratorio son válidos sólo para el uso que se indica en el presente informe.
 El presente informe es válido para fines de información y no constituye un certificado de garantía de calidad.
 El presente informe es válido para fines de información y no constituye un certificado de garantía de calidad.
 El presente informe es válido para fines de información y no constituye un certificado de garantía de calidad.

Calle 1000 - Arequipa - Perú
 Teléfono: (054) 258327 / E-mail: icma@icma.pe / www.icma.pe
 Cel. (054)-958311055 / 958357084

ANEXO 3-C: ANALISIS DE LABORATORIO PARA EFLUENTES DEL PIRS TARTADOS A 40mL/min. EN EL SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD



LABORATORIOS de ENSAYOS

ICMA-PERÚ S.A.C.

INFORME DE ENSAYO FISICO QUIMICO Nº 02-0573/13

I. Datos del Solicitante			
Razón Social	: GRACE ROSAS LA TORRE		
Dirección	: Los Laureles O-4 José Luis Bustamante y Rivero		
II. Datos del Servicio			
Nº de Solicitud de Servicio	: 02-0735/Agu/13		
Fecha de Ingreso	: 28-Septiembre-2013		
Servicio Solicitado	: ANALISIS FISICO QUIMICO		
III. Nombre del Producto			
	: AGUA TRATADA DE EFLUENTE		
IV. Datos de la Muestra			
Presentación	: Botella de vidrio		
Tipo de Sistema	: 17 Prototipo		
V. Aspectos Técnicos del Muestreo			
Muestreado por	: El Solicitante		
Fecha de Muestreo	: 21-09-2013		
Detalle de la Muestra	: Agua Tratada de Efluente (40 ml x 1 minuto) Laboratorio		
Tamaño de la Muestra	: Una (01) muestra de 250 mL.		
Identificación de la Muestra para Ensayos en Laboratorio	: 02-0573/13		
VI. Fecha de ensayo			
	: 28-09-2013		
VII. RESULTADOS			
DETALLE DE LA MUESTRA			
CODIGO	PRODUCTO	Hora Muestreo	
V-1	Agua Tratada de Efluente (40 ml x 1 minuto) Laboratorio	15:00	
ANALISIS FISICO QUIMICO			
REQUISITOS	VALOR OBTENIDO		
	Método de Referencia	Resultado	Unidad
Análisis (As)	EPA 200.7 Revisión 4.4	5.29 [5.72] 7.38	mg/L

ANEXO 3-D: ANALISIS DE LABORATORIO PARA EFLUENTES DEL PIRS TARTADOS A 80mL/min. EN EL SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD



LABORATORIOS de ENSAYOS

ICMA-PERU S.A.C.

INFORME DE ENSAYO FISICO QUIMICO N° 02-0574/13

I. Datos del Solicitante

Razón Social : GRACE ROSAS LA TORRE

Dirección : Los Laureles O-4 José Luis Bustamante y Rivero

II. Datos del Servicio

N° de Solicitud de Servicio : 02-0736/Agu/13

Fecha de Ingreso : 28-Setiembre-2013

Servicio Solicitado : ANALISIS FISICO QUIMICO

III. Nombre del Producto : AGUA TRATADA DE EFLUENTE

IV. Datos de la Muestra

Presentación : Botella de vidrio

Tipo de Sistema : 1/ Prototipo

V. Aspectos Técnicos del Muestreo

Muestreado por : El Solicitante

Fecha de Muestreo : 25-09-2013

Detalle de la Muestra : Agua Tratada de Efluente (40 ml x 1 minuto) Laboratorio

Tamaño de la Muestra : Una (01) muestra de 250 ml.

Identificación de la Muestra para Ensayos en Laboratorio : 02-0574/13

VI. Fecha de ensayo : 28-09-2013

VII. RESULTADOS

DETALLE DE LA MUESTRA

CÓDIGO	PRODUCTO	Hora Muestreo
V-1	Agua Tratada de Efluente (50 ml x 1 minuto) Laboratorio	18:00

ANALISIS FISICO QUIMICO

REQUISITOS	VALOR OBTENIDO		
	Método de Referencia	Resultado	Unidad
Arsénico (As)	EPA 200.7 Revisión 4.4	11.62 (5.89) 5.45	mg/L

Arequipa, 02 de Octubre del 2013



ICMA
Grupo Corporativo de
Cognatarios de Laboratorios
CRP 950

Este documento es válido sólo en original.
Prohibida su reproducción total o parcial en ningún caso, sin la autorización expresa de ICMA S.A.C.
Cualquier uso indebido o uso no autorizado será considerado como delito y será perseguido legalmente.
Los resultados obtenidos en los ensayos realizados sólo son válidos para el propósito que se declara.
Los métodos de laboratorio no deben ser utilizados como una herramienta de control de calidad y como certificado de calidad de calidad de la calidad que se produce.
El presente informe de análisis de muestra por sí mismo no garantiza, certifica o prueba de la calidad de un producto.
La calidad de los servicios, métodos, procesos, productos y/o servicios de ICMA S.A.C. depende de la calidad de los insumos.

Heb. Magisterial III Etapa B-6 Yanahuaza - Arequipa / TeleFon : (054) 258820
 Teléfono : (054) 258327 / E-mail : icma@icma.pe / www.icma.pe
 Cel. (054)-958311055 / 958357084

ANEXO 3-E: CONSTANCIA DE IDENTIFICACION DE *Chlorella vulgaris*



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERSARIUM AREQUIPENSE (HUSA)



"AÑO DE LA INVERSIÓN PARA EL DESARROLLO RURAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA"

CONSTANCIA N° 021-2013-HUSA

El Director del Herbarium Arequipense (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que las muestras de microalgas presentadas por las Bachilleres Galván Jiménez Katherin Greiss y Rozas Latorre Hilda Grace, egresadas de la Escuela Profesional y Académica de Ingeniería Biotecnológica de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María, para la ejecución de su Tesis: "Remoción de Arsénico III y Arsénico de Efluentes del Parque Industrial de Río Seco (PIRS), mediante bioabsorción con *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio". Las muestras fueron traídas al Laboratorio de Botánica provenientes de efluentes de la planta de tratamiento de Chilpina de la localidad de Socabaya-Arequipa, para su determinación en el Herbarium Arequipense (HUSA) y corresponde a la especie:

Chlorella vulgaris (M.W. Beyerinck 1890)

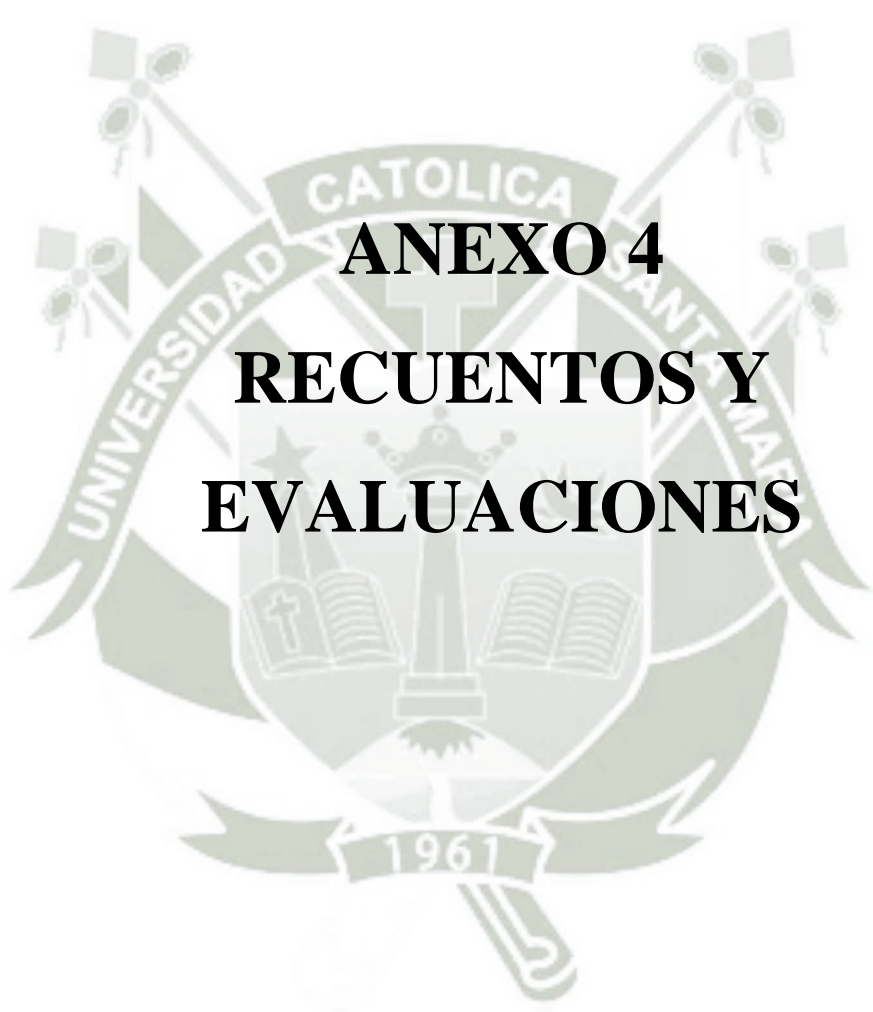
Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.

Arequipa 19 de Junio del 2013.



Blgo. Leoncio Marifo Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

Avenida Daniel Alcides Camón s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 984248574
Apartado Postal: 6028
AREQUIPA - PERU



ANEXO 4
RECUENTOS Y
EVALUACIONES

PRIMERA EVALUACION DEL RECUENTO DE *Chlorella vulgaris* DESPUES DE LA APLICACION DE CONCENTRACIONES DE ARSENICO III.

TRATAMIENTOS	FECHA DE CULTIVO	FECHA DE EVALUACION	SUMATORIA DE 4 CAMPOS	RECUENTO TOTAL (sumatoria 4 campos x160)
C	05/06/2013	10/06/2013	95	15200
T1	05/06/2013	10/06/2013	145	23200
T2	05/06/2013	10/06/2013	98	15680
T1	05/06/2013	10/06/2013	121	19360
C	05/06/2013	10/06/2013	110	17600
T3	05/06/2013	10/06/2013	136	21760
T1	05/06/2013	10/06/2013	215	34400
T2	05/06/2013	10/06/2013	170	27200
T3	05/06/2013	10/06/2013	130	20800
C	05/06/2013	10/06/2013	110	17600
T3	05/06/2013	10/06/2013	130	20800
T1	05/06/2013	10/06/2013	192	30720
T3	05/06/2013	10/06/2013	241	38560
C	05/06/2013	10/06/2013	282	45120
T2	05/06/2013	10/06/2013	121	19360
T2	05/06/2013	10/06/2013	148	23680
C	05/06/2013	10/06/2013	294	47040
T1	05/06/2013	10/06/2013	138	22080
T2	05/06/2013	10/06/2013	161	25760
C	05/06/2013	10/06/2013	137	21920
T1	05/06/2013	10/06/2013	240	38400
T3	05/06/2013	10/06/2013	171	27360
T2	05/06/2013	10/06/2013	195	31200
T3	05/06/2013	10/06/2013	93	14880

SEGUNDA EVALUACIÓN DEL RECUENTO DE *Chlorella vulgaris* DESPUES DE LA APLICACIÓN DE CONCENTRACIONES DE ARSENICO III.

TRATAMIENTOS	FECHA DE CULTIVO	FECHA DE EVALUACION	SUMATORIA DE 4 CAMPOS	RECUENTO TOTAL (sumatoria 4 campos x160)
C	05/06/2013	15/06/2013	184	29440
T1	05/06/2013	15/06/2013	350	56000
T2	05/06/2013	15/06/2013	253	40480
T1	05/06/2013	15/06/2013	246	39360
C	05/06/2013	15/06/2013	191	30560
T3	05/06/2013	15/06/2013	220	35200
T1	05/06/2013	15/06/2013	230	36800
T2	05/06/2013	15/06/2013	262	41920
T3	05/06/2013	15/06/2013	294	47040
C	05/06/2013	15/06/2013	130	20800
T3	05/06/2013	15/06/2013	275	44000
T1	05/06/2013	15/06/2013	310	49600
T3	05/06/2013	15/06/2013	364	58240
C	05/06/2013	15/06/2013	215	34400
T2	05/06/2013	15/06/2013	254	40640
T2	05/06/2013	15/06/2013	319	51040
C	05/06/2013	15/06/2013	229	36640
T1	05/06/2013	15/06/2013	231	36960
T2	05/06/2013	15/06/2013	157	25120
C	05/06/2013	15/06/2013	211	33760
T1	05/06/2013	15/06/2013	263	42080
T3	05/06/2013	15/06/2013	192	30720
T2	05/06/2013	15/06/2013	299	47840
T3	05/06/2013	15/06/2013	225	36000

TERCERA EVALUACIÓN DEL RECUENTO DE *Chlorella vulgaris* DESPUES DE LA APLICACIÓN DE CONCENTRACIONES DE ARSENICO III.

TRATAMIENTOS	FECHA DE CULTIVO	FECHA DE EVALUACION	SUMATORIA DE 4 CAMPOS	RECUENTO TOTAL (sumatoria 4 campos x160)
C	05/06/2013	20/06/2013	155	24800
T1	05/06/2013	20/06/2013	377	60320
T2	05/06/2013	20/06/2013	270	43200
T1	05/06/2013	20/06/2013	315	50400
C	05/06/2013	20/06/2013	229	36640
T3	05/06/2013	20/06/2013	285	45520
T1	05/06/2013	20/06/2013	228	36400
T2	05/06/2013	20/06/2013	257	41120
T3	05/06/2013	20/06/2013	352	56320
C	05/06/2013	20/06/2013	178	28480
T3	05/06/2013	20/06/2013	380	60800
T1	05/06/2013	20/06/2013	345	55200
T3	05/06/2013	20/06/2013	429	68640
C	05/06/2013	20/06/2013	226	36080
T2	05/06/2013	20/06/2013	336	53760
T2	05/06/2013	20/06/2013	337	53920
C	05/06/2013	20/06/2013	360	57600
T1	05/06/2013	20/06/2013	210	33600
T2	05/06/2013	20/06/2013	218	34880
C	05/06/2013	20/06/2013	150	24000
T1	05/06/2013	20/06/2013	265	42400
T3	05/06/2013	20/06/2013	267	42720
T2	05/06/2013	20/06/2013	300	48000
T3	05/06/2013	20/06/2013	311	49760

**CUARTA EVALUACIÓN DEL RECUENTO DE *Chlorella vulgaris* DESPUES DE LA APLICACIÓN DE
CONCENTRACIONES DE ARSENICO III.**

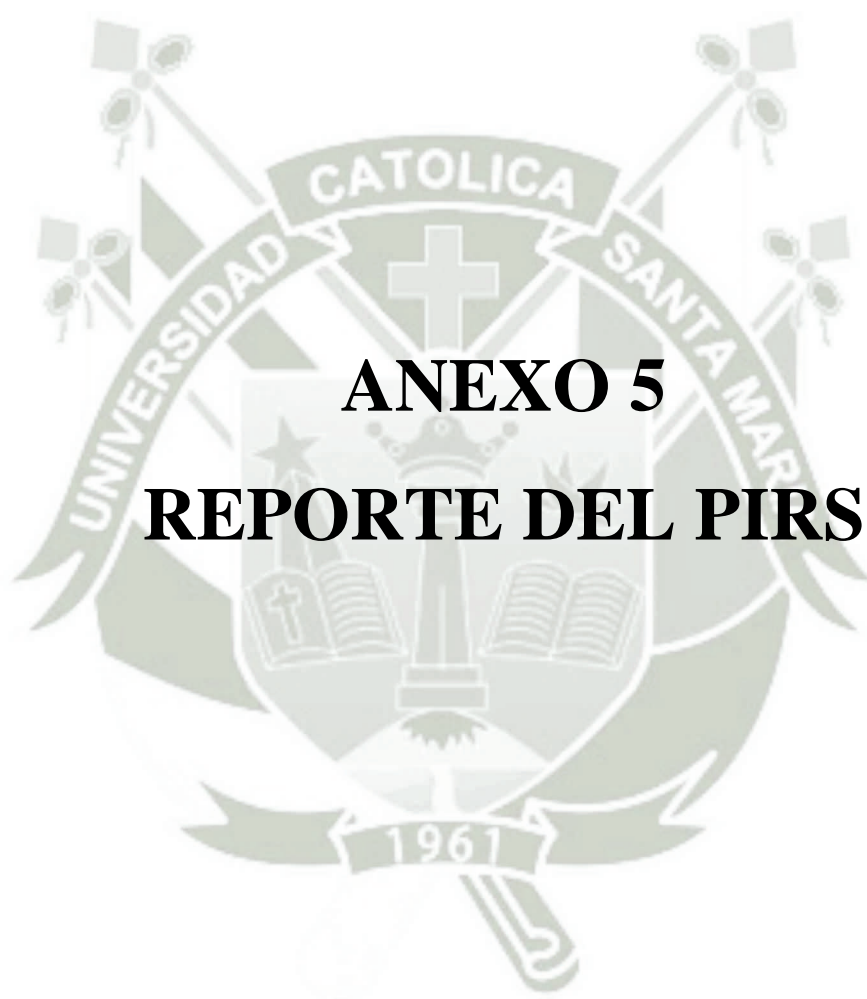
TRATAMIENTOS	FECHA DE CULTIVO	FECHA DE EVALUACION	SUMATORIA DE 4 CAMPOS	RECUENTO TOTAL (sumatoria 4 campos x160)
C	05/06/2013	25/06/2013	225	36000
T1	05/06/2013	25/06/2013	432	69120
T2	05/06/2013	25/06/2013	343	54880
T1	05/06/2013	25/06/2013	323	51600
C	05/06/2013	25/06/2013	260	41600
T3	05/06/2013	25/06/2013	476	76160
T1	05/06/2013	25/06/2013	265	42400
T2	05/06/2013	25/06/2013	372	59520
T3	05/06/2013	25/06/2013	400	64000
C	05/06/2013	25/06/2013	288	46080
T3	05/06/2013	25/06/2013	459	73440
T1	05/06/2013	25/06/2013	403	64480
T3	05/06/2013	25/06/2013	530	84800
C	05/06/2013	25/06/2013	320	51200
T2	05/06/2013	25/06/2013	340	54400
T2	05/06/2013	25/06/2013	350	56000
C	05/06/2013	25/06/2013	358	57200
T1	05/06/2013	25/06/2013	348	55680
T2	05/06/2013	25/06/2013	265	42400
C	05/06/2013	25/06/2013	272	43520
T1	05/06/2013	25/06/2013	327	52320
T3	05/06/2013	25/06/2013	378	60400
T2	05/06/2013	25/06/2013	343	54880
T3	05/06/2013	25/06/2013	433	69200

VALORES DE LA CONCENTRACION DE CLOROFILA A POR MUESTRA

REPETICIONES	CULTIVO DE <i>C. vulgaris</i>	SISTEMA A 20 mL/min.	SISTEMA A 40 mL/min.	SISTEMA A 80 mL/min.
1	147.54	73.2	39.02	33.35
2	153.59	80.03	38.94	35
3	160.42	91.33	42.58	41.87

VALORES DE LA CONCENTRACION DE ARSENICO RESIDUAL POR MUESTRA

REPETICIONES	EFLUENTES	SISTEMA A 20 mL/min.	SISTEMA A 40 mL/min.	SISTEMA A 80 mL/min.
1	11.73	3.79	9.28	11.62
2	9.98	5.82	8.72	9.89
3	11.56	3.68	7.38	9.45



ANEXO 5

REPORTE DEL PIRS

INFORME DE EFLUENTES DEL PIRS
FUENTE: INFORME DEL PLAN DE ADECUACIÓN AMBIENTAL PIRS AREQUIPA. SECRETARÍA
EJECUTIVA REGIONAL DEL AMBIENTE AREQUIPA-MOQUEGUA-TACNA CONAM 2012

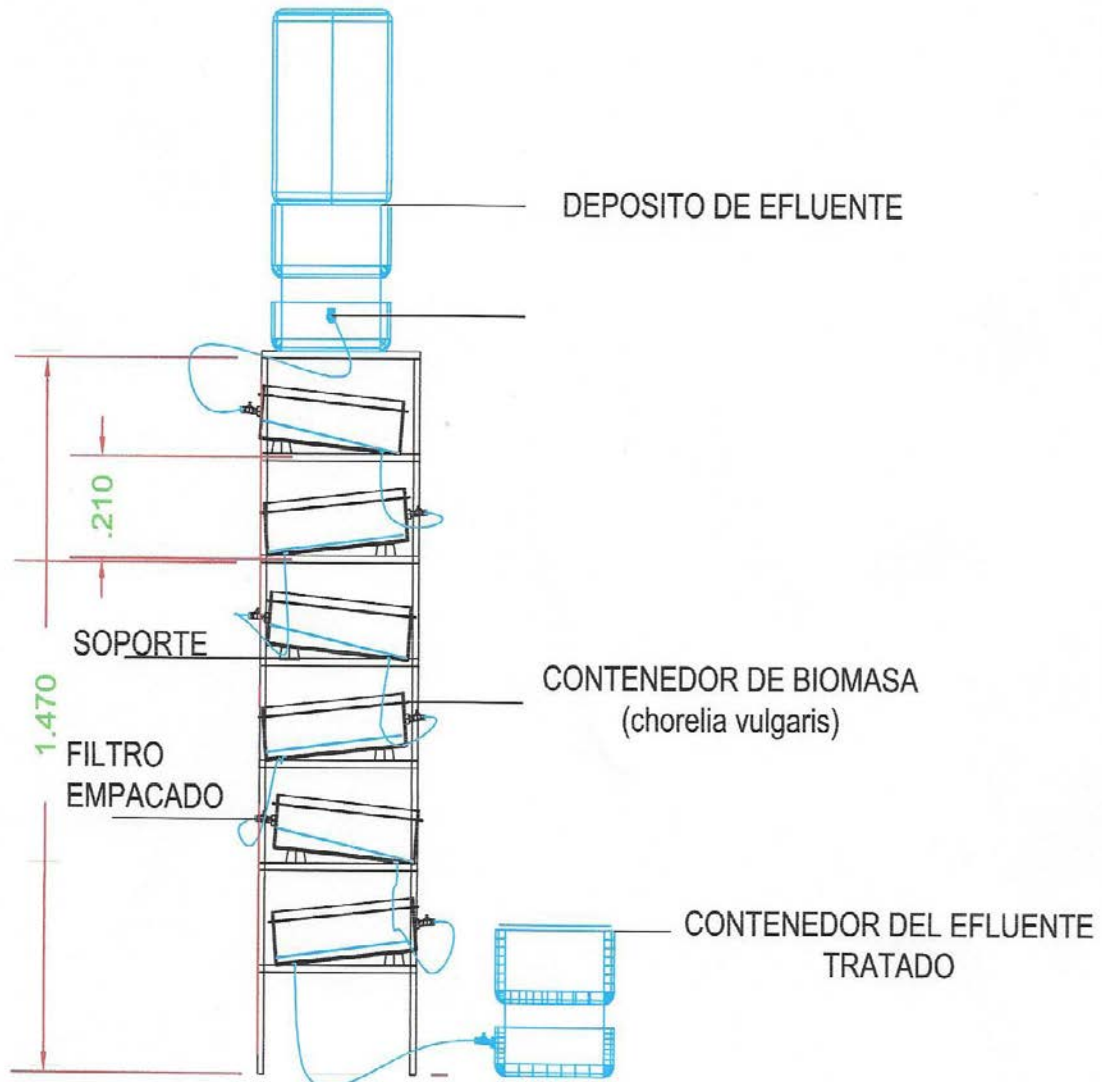
Muestra	Ribera	Curtido	Acabado	Efluente Final
pH	12,65	3,62	4,77	10,68
Temp.°C	19,8	27,2	31,0	20,90
N amoniacalmg/l	72,4	1 062,4	106,4	147,1
Aceites y grasas mg/l	238,4	26,3	0,2	8,6
DQO mg/l	27 950	8 975	15 638	3 788
DBO mg/l	9 625	4 560	7 825	2 250
Sólidos suspendidos mg/l	14 530	877	823	1 473
Sulfuros mg/l	2 315			2 773,5
Cr2O3 mg/l		5 726	228	55,7
Cr+6 mg/l		-0,1	-0,1	-0,1





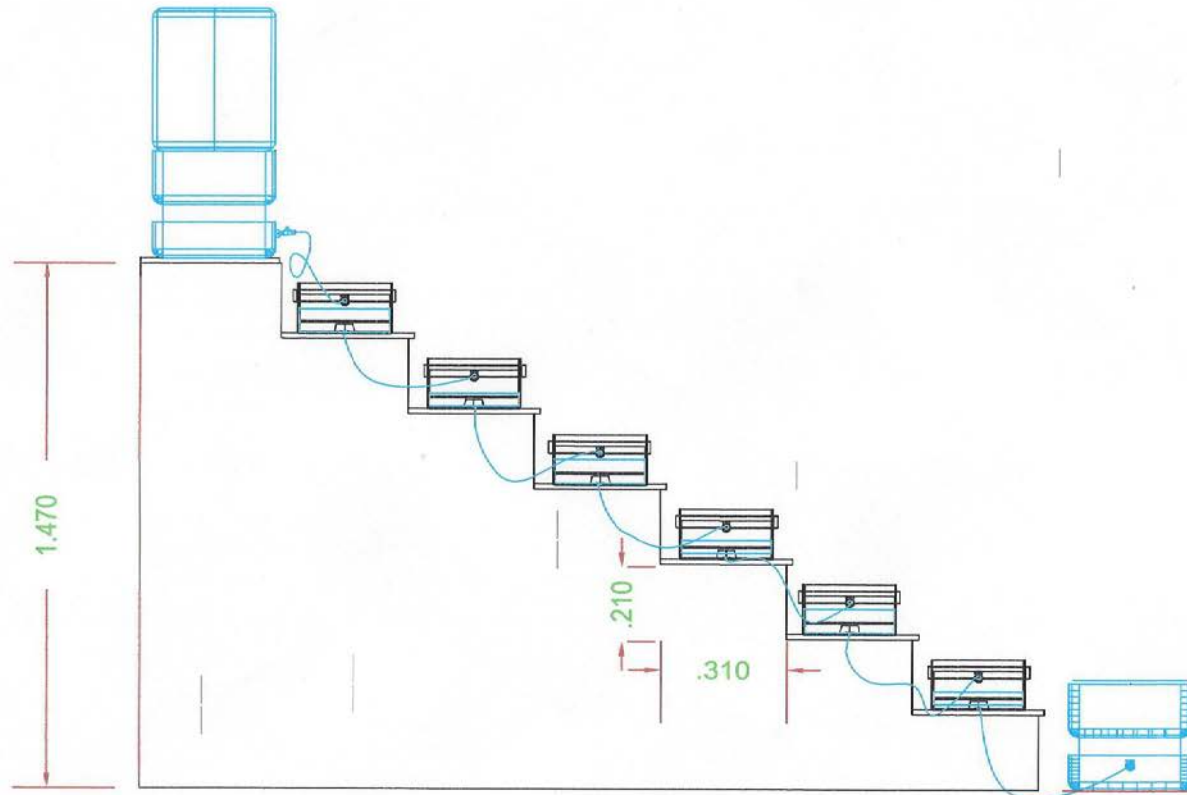
ANEXO 6
PLANOS DEL SISTEMA DE
FLUJO POR GRAVEDAD

DCR DEL SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD FRONTAL



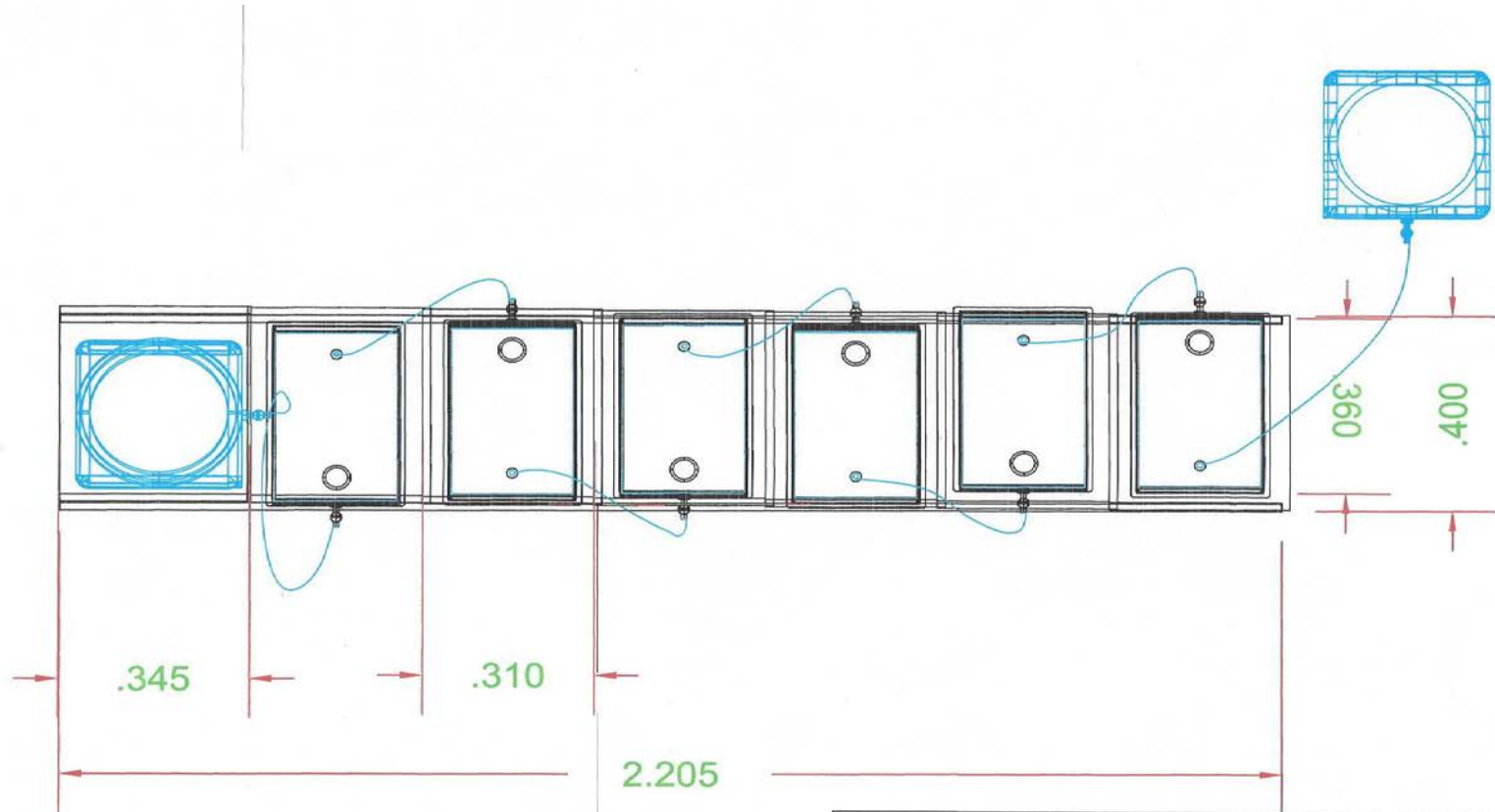
DCR SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD					
BACH. KATHERIN GALVAN JIMENEZ BACH. GRACE ROZAS LATORRE					ESCALA : 1/1
Dibujo	Nombre		Modificación		PLANO N°
	FRONTAL				01

DCR DEL SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD LATERAL IZQUIERDA



DCR SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD					
BACH. KATHERIN GALVAN JIMENEZ BACH. GRACE ROZAS LATORRE					ESCALA : 1/25000
	Nombre		Modificación		PLANO N°
Dibujo	LATERAL IZQUIERDA				02

DCR DEL SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD VISTA EN PLANTA



DCR SISTEMA DE FLUJO POR GRAVEDAD					
BACH. KATHERIN GALVAN JIMENEZ BACH. GRACE ROZAS LATORRE					ESCALA : 1/25000
Dibujo	Nombre		Modificación		PLANO N°
	VISTA EN PLANTA				03