

Remoción de metales pesados (mercurio y plomo) de soluciones acuosas sintéticas a diferentes concentraciones utilizando la microalga dulceacuícola *Scenedesmus*

acutus.

Lucia Chulle R⁴., Pablo Villalobos B⁴., Consuelo Rojas I¹., César Cabrejos M².,
Katherine Ipanaqué M³.,

Resumen

En el presente trabajo de investigación se evaluó los niveles de remoción de dos metales pesados (mercurio y plomo) por parte de la microalga *Scenedesmus acutus* así como el crecimiento celular del alga frente a los metales, para ello los cultivos fueron expuestos a diferentes concentraciones de metales en un rango de 5, 10, 15, 20 y 30 mg/L; obteniéndose una eficiencia de remoción de hasta 97,68% para plomo y de 93% para mercurio después de 4 días de exposición a los metales, en cuanto al ensayo de toxicidad se obtuvieron resultados de tolerancia y estímulo del crecimiento por parte del plomo, sin embargo cuando el cultivo microalgal fue expuesta a concentraciones de mercurio fue afectado negativamente en su crecimiento.

Palabras clave: *Scenedesmus acutus*, adsorción, toxicidad, remoción, metales pesados.

Removal of heavy metals (mercury and lead) from synthetic aqueous solutions at different concentrations using the fresh aquatic microalga *Scenedesmus acutus*.

Abstract

In the present work the levels of removal of two heavy metals (mercury and lead) by the microalga *Scenedesmus acutus* as well as the cellular growth of the alga against the metals are evaluated, for that the cultures were exposed to different concentrations of Metals in the range of 5, 10, 15, 20 and 30 mg / L; Obtaining a removal efficiency of up to 97.68% for lead and 93% for mercury after 4 days of exposure to the metals. As for the toxicity test, lead tolerance and growth stimulation results were obtained without However, when the microalgal culture was exposed to mercury concentrations, it was adversely affected.

Keywords: *Scenedesmus acutus*, adsorption, toxicity, removal, heavy metals.

¹ Docente de Botánica Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo crojasi2002@yahoo.es

² Docente de Microbiología. Universidad de Lambayeque. UDL ceili_22@hotmail.com

³ Docente de Fisiología. Universidad de San Martín de Porres doc_erika@hotmail.com

⁴ Egresados de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNPRG luxvi57@gmail.com
djpablo_21@hotmail.com

Introducción

Hoy en día, la problemática de la contaminación con metales pesados en ríos y mares se está incrementando con el crecimiento del desarrollo industrial, los metales pesados han sido reconocidos como peligrosos para la salud del hombre y la biota acuática dados los impactos negativos que pueden generarse incluso cuando estos se encuentren en concentraciones muy bajas. Actualmente una de las más importantes rutas de exposición es la ingesta de agua debido a la contaminación de acuíferos. Según el Ministerio del Ambiente, señala que el deterioro de la calidad de agua peruana se debe a que en ella se vierten efluentes domésticos e industriales (minería, agroquímica), conteniendo residuos químicos de actividades ilícitas, lixiviados provenientes de relaves de la minería (Brack et al. 2011).

Durante el proceso evolutivo, los organismos acuáticos y terrestres han desarrollado diversas estrategias para mantener una relación equilibrada con iones de metales pesados presentes en el medio circundante. La microalga cenobial *Scenedesmus acutus*, ha desarrollado la capacidad de sintetizar péptidos capaces de inmovilizar los metales pesados. Estas moléculas como

complejos organometálicos son llevadas en el interior de las vacuolas para facilitar el control adecuado de la concentración citoplasmática de los iones de metales pesados, y por tanto, prevenir o neutralizar sus posibles efectos tóxicos (Cobbett 2012).

Se indica que las microalgas son más eficientes en la remoción de metales pesados en comparación con las bacterias y hongos. Probablemente porque los procesos llevados a cabo por microalgas vivas están asociados con actividades metabólicas y fotosintéticas. Además, las microalgas poseen una alta tolerancia a concentraciones elevadas de metales pesados (Khoshmanesh 1997).

El uso de procesos biológicos en ambientes contaminados presenta algunas ventajas con respecto a las tecnologías tradicionales: suele ser más económico, menos contaminante y de mayor eficacia para grandes volúmenes y pequeñas concentraciones. Los metales pesados a diferencia de los contaminantes orgánicos, no pueden ser degradados, por ello, los procesos de remediación se reducen a provocar la movilización y/o inmovilización de los mismos (Flathman 1998).

Teniendo en cuenta lo planteado, se determinó la capacidad de remoción y tolerancia de los metales pesados (mercurio y plomo) por parte de la microalga *Scenedesmus acutus*, expuesta a diferentes concentraciones. Se escogió este género de microalga ya que los reportes locales sobre su uso son escasos

y se presenta como una opción de biorremediación de ecosistemas acuáticos por su capacidad de tolerancia a la toxicidad de metales. Así mismo, en nuestro país, el uso de ésta biotecnología puede convertirse en una opción viable ofreciendo una manera natural para el tratamiento de metales en efluentes.

Material y Métodos

Material biológico.- El material biológico, estuvo conformado por cultivo microalgal puro de *S.acutus* donado por el laboratorio de Planctología de la Universidad Nacional del Santa, Chimbote; el cual fue previamente identificado (Fig. 1).

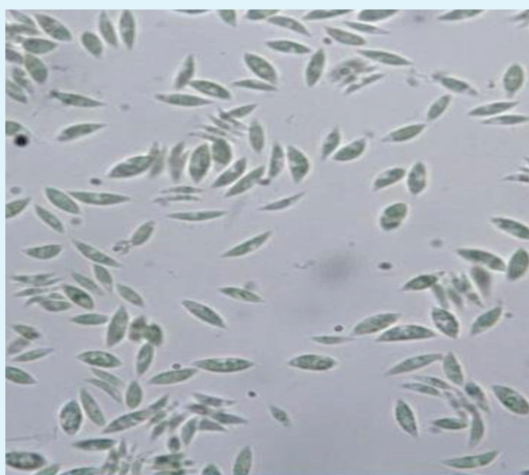


Figura 1. *S. acutus*, bajo la luz del microscopio.

Diseño metodológico.- Para determinar la tolerancia de la microalga *S.acutus* en diferentes concentraciones de mercurio y plomo presentes en soluciones acuosas sintéticas se realizó un estudio de tipo

experimental con ensayos independientes y tres repeticiones para todos los tratamientos, siguiendo los lineamientos de un diseño experimental con estímulo creciente.

Cultivo y mantenimiento.- La desinfección del área de trabajo se hizo con etanol al 70%. Para la limpieza de los materiales de vidrio se utilizó detergente e hipoclorito de sodio y varios lavados con abundante agua. Para los medios de cultivo y soluciones se utilizó la autoclave. La presencia de un mechero fue requerido para la siembra, transferencia y manipulación de la cepa (Romo 2012).

Para el crecimiento y mantenimiento del alga, se utilizó el medio de cultivo líquido Bold's Basal Medium (BBM) (Andersen 2005) modificado (Tabla 1), para esto, 10 ml de cultivo algal fue

inoculado en un matraz (estéril y taponado con algodón) conteniendo 90 ml de medio de cultivo líquido Bold's Basal Medium (BBM) modificado, los matraces se inocularon a temperatura ambiente, bajo iluminación continua (24 horas) con lámparas fluorescentes de luz blanca, sin aireación y con una agitación manual diaria. Después de 5 días, fueron analizados para descartar su contaminación por rotíferos, bacterias y otros géneros de microalgas. Para determinar la presencia de rotíferos se observó directamente al microscopio, para bacterias se realizó una coloración Gram, para conservar la cepa de *S. acutus* se realizó una siembra en medio sólido. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se tomó 1mL de cultivo algal, se vertió en un tubo de ensayo que contenía medio BBM modificado líquido, los tubos inoculados se agitaron dos veces al día, se colocaron a temperatura ambiente, iluminación continua con lámparas fluorescentes de luz blanca y sin aireación.

Después de 15 días, el contenido del tubo de ensayo fue vertido en un matraz que contenía medio de cultivo, los matraces inoculados se agitaron dos veces al día con la finalidad de evitar que las células se sedimenten y mueran y fueron conservadas en las mismas condiciones. Posteriormente, el contenido del matraz fue vertido en botellas de 1L de capacidad, las botellas inoculadas se mantuvieron a temperatura ambiente, iluminación continua con lámparas fluorescentes de luz blanca, constante agitación mediante bombas de aireación (esto se realizó con la finalidad de evitar la sedimentación celular permitiendo su homogenización); el aire fue depurado para evitar contaminación con microorganismos ambientales, para ello, el sistema estuvo precedido por dos botellas, la primera contenía 200 mL de agua destilada estéril y 1mL de ácido nítrico 0.5 %, la segunda botella contenía solo 200 mL de agua destilada estéril (Guillard 1973).

Tabla 1. Composición del medio Bold's Basal modificado.

REACTIVO	COMPOSICION (mg/L)*
Urea	500
CaCl ₂ .H ₂ O	25
MgSO ₄ .7H ₂ O	75
K ₂ HPO ₄	75
KH ₂ PO ₄	175
NaCl	25
FeSO ₄ .7H ₂ O	4,98
H ₂ SO ₄	0,001(mL/L)
H ₃ BO ₃	11,42
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,82
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57

*Las cantidades indicadas se diluyen en agua destilada y el pH se ajusta a 6,5 con NaOH (0,1N) y H₂SO₄ (0,1N).

Fases de crecimiento.- Para identificar las diferentes fases de crecimiento del cultivo, las botellas de vidrio (1 L de capacidad) que contenían medio BBM fueron inoculadas con cultivo de *S.acutus* (de 4 días de edad), bajo condiciones de temperatura ambiente, aireación, iluminación continua con lámparas fluorescentes de 40 Watts de luz blanca y agitación mediante bombas de aireación. El crecimiento fue

registrado cada 24 horas, durante 15 días se tomaron muestras de los cultivos para hacer conteos celulares en cámara de Neubauer y lecturas de absorbancia con espectrofotómetro. Con los valores obtenidos, se determinó la tasa de crecimiento (Ke), el número de generaciones por día (n), divisiones por día (K), tiempo de duplicación (Td) por día y por horas; para esto se aplicaron las siguientes fórmulas (Guillard 1973):

$$K_e = \frac{\ln(N_1 / N_0)}{t_1 - t_0}$$

$$K = \frac{K_e}{\ln 2}$$

$$T_d = \frac{1}{k}$$

$$n = \frac{t}{T_d}$$

Donde:

N₁: concentración final (cel/mL)

N₀: concentración inicial (cel/mL)

t₁: tiempo final (días)

t₀: tiempo inicial (días)

ln 2 = 0.6931

Inoculación de metales.- Se inoculó 70 mL de *S.acutus* en fase exponencial en botellas de vidrio de 1 L de capacidad que contenían 630 mL de medio BBM, los cultivos se iniciaron con una absorbancia de 0.1 nm. Cuando los cultivos iniciaron la fase logarítmica (2^o día), se adicionó soluciones de mercurio y plomo (ambos metales se trabajaron por separado) en las concentraciones de: 0 (control negativo), 5, 10, 15, 20, 30 mg.L. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente, iluminación continua con lámparas fluorescentes (40 Watts) y con aireación. Esto se realizó por triplicado. (Fig. 2)

La finalidad fue evaluar el efecto de los metales sobre el crecimiento celular y el número de divisiones por día de *S.acutus*, para ello fue necesario tomar muestras a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas. De cada una de las muestras se realizó lecturas de absorbancia a 685nm, las lecturas se realizaron por triplicado y el medio de cultivo BBM actuó como blanco.



Figura 2. A) Inoculación del cultivo en fase exponencial en medio BBM. B) Adición de metales en el cultivo. C) Cultivos algales expuestos a las diferentes concentraciones de mercurio (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) con su control negativo. D) Cultivos algales expuestos a las diferentes concentraciones de plomo (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) con su control negativo.

Análisis de datos.- Para determinar el crecimiento celular de *S.acutus* (toxicidad) frente a los metales y el número de divisiones, se aplicó un análisis de varianza. Así mismo se utilizó la prueba discriminativa de “Tukey”, para ello se hizo uso del software estadístico “Stadística” ver 12.0. Para el ensayo de remoción se midió la concentración de plomo mediante espectrofotometría de absorción atómica con flama y para mercurio se realizó por

espectrofotometría de absorción atómica a vapor frío.

La eficiencia de la remoción se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Remoción} = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100$$

Dónde:

ci = concentración inicial del metal

cf = concentración final del metal

Resultados

Se registró el crecimiento de *S.acutus* midiendo su densidad celular con cámara de Neubauer y absorbancia a 685nm en espectrofotómetro UV cada 24 horas durante 15 días (Tabla 2), así también la tasa de crecimiento (Ke), divisiones por día (K), tiempo de duplicación (Td), generaciones por día (n) (Tabla 3). Se logró identificar las diferentes fases de crecimiento de *S.acutus* cuya fase de

adaptación es menos de 24 horas, la fase exponencial comenzó aproximadamente después de las 24 horas de incubación y continuó hasta el día 10, donde se observó su máxima densidad con una absorbancia de 2,173nm y un conteo celular de $8,90 \times 10^6$ cel. mL. La fase estacionaria inició el día 11 y culminó el día 12, la fase de muerte empezó el día 13 (Tabla 2).

Tabla 2. Densidad celular promedio (DCP): conteo en espectrofotómetro UV a 685 nm y en cámara de Neubauer ($N^\circ \text{cel/mL} \times 10^6$).

MUESTREO (días)	ABSORBANCIA	CONTEO CELULAR
	DCP	DCP (1×10^6 cel/mL.)
0	0,102	2,73
1	0,139	3,17
2	0,342	3,50
3	0,561	4,37
4	0,754	4,55
5	1,115	5,25
6	1,433	5,90
7	1,712	6,27
8	1,956	7,63
9	2,141	8,45
10	2,173	8,90
11	2,074	8,32
12	1,971	7,93
13	1,905	7,35
14	1,803	6,55
15	1,772	6,05

Tabla 3. Valores de tasa de crecimiento (Ke), divisiones por día (K), tiempo de duplicación (Td) y numero de generaciones (n) de *S. acutus*.

Interv. Días	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10-11	11-12	12-13	13-14	14-15
N_1/N_2	1,16	1,11	1,25	1,04	1,15	1,12	1,06	1,22	1,11	1,05	0,93	0,95	0,93	0,89	0,92
$\ln N_1/N_2$	0,15	0,1	0,22	0,04	0,14	0,11	0,06	0,2	0,1	0,05	-0,07	-0,05	-0,07	-0,12	-0,08
t_2-t_1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ke	0,15	0,1	0,22	0,04	0,14	0,11	0,06	0,2	0,1	0,05	-0,07	-0,05	-0,07	-0,12	-0,08
K	0,22	0,14	0,32	0,06	0,2	0,16	0,09	0,29	0,14	0,07	-0,1	-0,07	-0,1	-0,17	-0,12
T_d (días)	4,55	7,14	3,13	16,67	5	6,25	11,11	3,45	7,14	14,29	-10	-14,29	-10	-5,88	-8,33
n	0,22	0,14	0,32	0,06	0,2	0,16	0,09	0,29	0,14	0,07	-0,1	-0,07	-0,1	-0,17	-0,12

La densidad celular de *S.acutus* frente a los metales expuestos se determinó midiendo su absorbancia y conteo celular a las 0, 24, 48, 72, 96 horas del cultivo control y de las muestras expuestas a diferentes concentraciones de mercurio y plomo (5, 10, 15, 20, 30 mg/L), en donde se pudo observar diferencias claras en el crecimiento celular de la microalga.

La concentración más baja de plomo (5 mg/L) no influyó en el crecimiento celular, mostrándose un crecimiento similar al cultivo control, la concentración de 10 mg/L influyó positivamente en el crecimiento celular de *S.acutus* resultando leves estímulos en

su crecimiento a las 48 horas de la exposición al metal (7,04 % después de 48 horas de exposición), mientras que las demás concentraciones (15, 20 y 30 mg/L) ocasionaron una clara reducción en su crecimiento (Fig. 3).

Por otra parte, cuando el cultivo algal fue expuesto a concentraciones de mercurio de 5, 10, 15, 20 y 30 mg/L, ocasionó una clara disminución en su crecimiento (Fig. 4 y 5), se observaron inhibiciones del crecimiento celular de 35,41% cuando se trató con 5 mg/L Hg, 35,73% cuando se trató con 10 mg/L Hg, 37,16% para 15 mg/L Hg, 37,96% para 20 mg/L Hg y 38,19% para el tratamiento con 30 mg/L Hg.

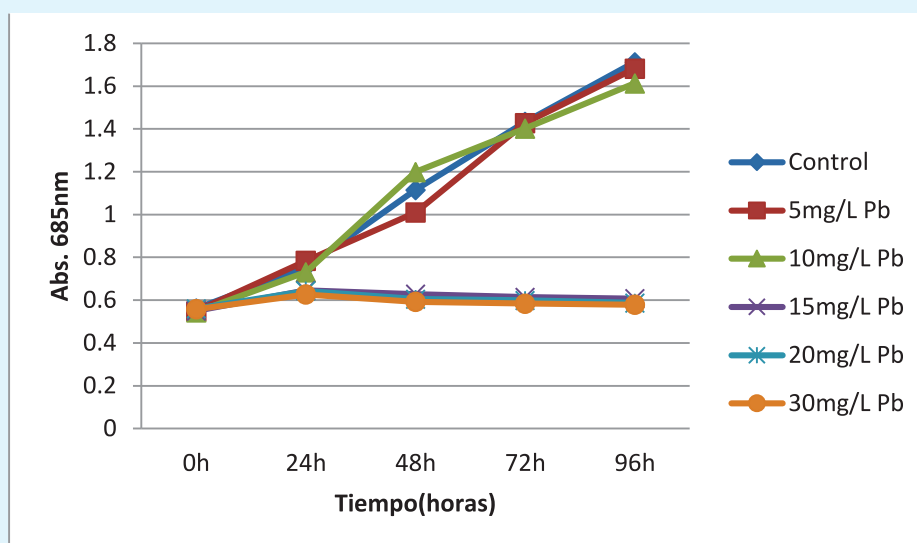


Figura 3. Grafica que muestra el efecto de cinco concentraciones de plomo (mg/L) y una muestra control sobre el crecimiento (685nm) de *S. acutus* cultivada en medio BBM a temperatura ambiente, aireación y luz continua.

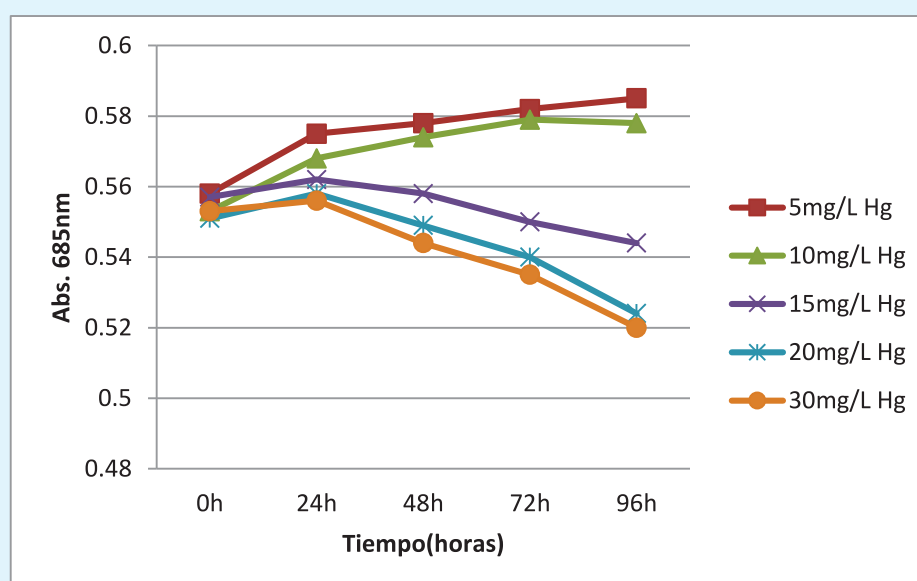


Figura 4. Grafica que muestra el efecto de cinco concentraciones de mercurio (mg/L) y una muestra control sobre el crecimiento (685nm) de *S. acutus* cultivada en medio BBM a temperatura ambiente, aireación y luz continua.

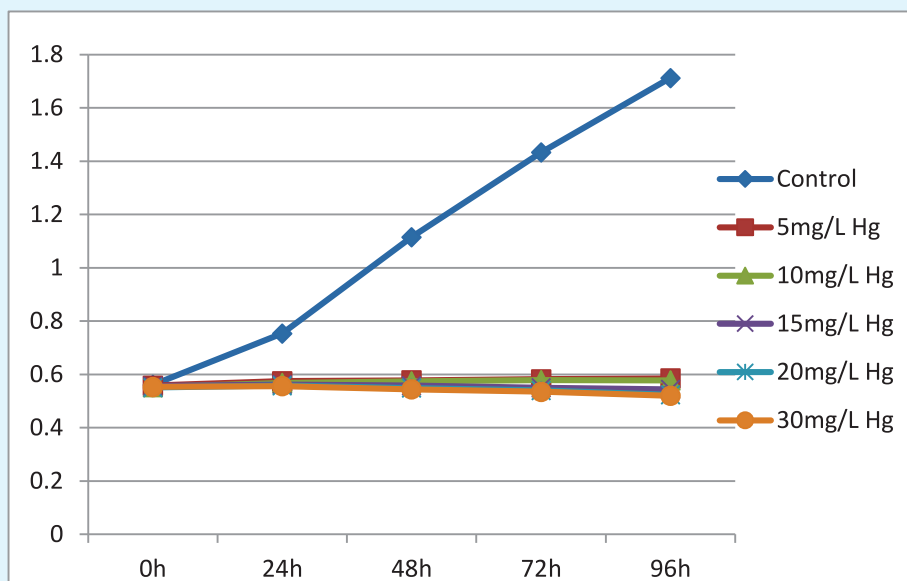


Figura 5. Grafica que muestra el efecto de cinco concentraciones de mercurio (mg/L) sin la muestra control sobre el crecimiento (685nm) de *S. acutus* cultivada en medio BBM a temperatura ambiente, aireación y luz continua.

La prueba del análisis de varianza de los valores promedios para ambos metales resultaron ser significativos, lo que demuestra que existió efecto de los tratamientos en la variable estudiada (Tablas 4 y 6). Según la prueba discriminadora de Tukey para mercurio el mayor valor de concentración celular se obtuvo con el cultivo control (sin adición de metal) diferenciándose estadísticamente de los demás tratamientos (Tabla 5). Para el tratamiento con plomo el mayor valor de

concentración celular se obtuvo con el cultivo control (sin adición de metal), sin embargo para el tratamiento con 10 mg/L de plomo se puede observar un ligero crecimiento celular (Tabla 7).

Para el ensayo de remoción, los cultivos de *S.acutus* se filtraron después de cuatro días de exposición a los metales (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y se determinaron las concentraciones finales; con los valores obtenidos se obtuvo el porcentaje de remoción para cada metal.

Tabla 7. Prueba discriminatoria de Tukey ($\alpha=0,05$) de los valores promedio de *S.acutus* por efecto de cinco concentraciones de plomo (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control.

Concentración	Media estimada	Grupos	
30 mg/L	0,588000	a	
20 mg/L	0,598800	a	b
15 mg/L	0,609000		b
5 mg/L	1,090400		c
10 mg/L	1,097800		c
Control	1,115000		d

Tabla 8. Remoción de plomo con *S.acutus*. Ci (concentración inicial), Cf (concentración final).

Ci (mg/L)	Cf (mg/L)	% Remoción
5	0,116	97,68
10	0,273	97,27
15	1,492	90,05
20	2,045	89,77
30	3,143	89,52

Tabla 9. Remoción de mercurio con *S.acutus*. Ci (concentración inicial), Cf (concentración final).

Ci (mg/L)	Cf (mg/L)	% Remoción
5	0,343	93,00
10	0,950	90,50
15	1,633	89,10
20	2,325	88,37
30	3,715	87,60

Discusión

En este trabajo de investigación, la tasa de crecimiento y crecimiento celular de *S.acutus* fueron usados como parámetros para evaluar la respuesta de la microalga a la toxicidad de los metales usados (plomo, mercurio) las cuales mostraron diferencias significativas con el cultivo control. Según los resultados obtenidos, para el tratamiento con mercurio, se

observó inhibición de los resultados a medida que la concentración se incrementaba.

Para el ensayo de toxicidad con plomo se observó que la concentración más baja (5mg/L), no tuvo un efecto estimulador en el crecimiento celular ni en la tasa de crecimiento, mostrándose la tolerancia de *S.acutus* frente a la exposición de

Tabla 4. Análisis de varianza de los valores promedio de *S.acutus* por efecto de cinco concentraciones de mercurio (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control.

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P
Tiempo	0,42910	4	0,10728	3910	0,00
Concentración (CC)	3,87743	5	0,77549	28268	0,00
Tiempo * CC	2,26226	20	0,11311	4123	0,00
Error	0,00165	60	0,00003		

Tabla 5. Prueba discriminatoria de Tukey ($\alpha=0,05$) de los valores promedio de *S.acutus* por efecto de cinco concentraciones de mercurio (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control.

Concentración	Media estimada	Grupos	
30 mg/L	0,541600	a	
15 mg/L	0,553400		b
20 mg/L	0,553400		b
10 mg/L	0,570400		c
5 mg/L	0,575600		c
Control	1,115000		d

Tabla 6. Análisis de varianza de los valores promedio de *S.acutus* por efecto de cinco concentraciones de plomo (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control.

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P
Tiempo	3,87423	4	0,96856	8496,1	0,00
Concentración (CC)	5,68872	5	1,13774	9980,2	0,00
Tiempo * CC	3,84817	20	0,19241	1687,8	0,00
Error	0,00684	60	0,00011		

plomo a esta concentración, para la concentración de 10 mg/L se observó un efecto estimulante sobre los parámetros evaluados.

Según El-Sheekl et.al (2003), a bajas concentraciones, la sustitución de plomo por el zinc en algunas metalo enzimas puede ocasionar el incremento del crecimiento, por lo cual el plomo en concentraciones traza en algunos géneros de microalgas es usado para su metabolismo. Por otra parte, el efecto del plomo a concentraciones más elevadas (15, 20, 30 mg/L), resultó ser tóxico para el alga, observándose disminución en su crecimiento celular; ésta toxicidad pudo ser debido al efecto inhibitorio del plomo sobre la fotosíntesis, respiración, síntesis enzimática, proteínas y ácidos nucleicos, se menciona también, que altas concentraciones de plomo afectan la división celular del alga en fase estacionaria inhibiendo la tasa de crecimiento (Leborans y Naviolla 1996).

En ensayos realizados en 2007 se obtuvieron resultados similares al exponer a *S.platensis* frente al plomo, registrándose estimulación del crecimiento al ser expuesta a concentraciones bajas (1,2,3ug/L), mientras que concentraciones más altas (4,5ug/L) ejercieron un efecto adverso (Arunakumara 2007).

Cuando se estudió el efecto de los metales pesados sobre algas, se encontró que la tasa de crecimiento disminuyó con altas concentraciones de metales debido a que el plomo a concentraciones elevadas puede destruir la membrana de los cloroplastos y tilacoides del alga (Faryasova 1999, Ahmed 2008). Según los reportes mencionados la inhibición del crecimiento depende de la dosis a la que es expuesta el alga tal y como se demostró en esta investigación.

Diversos investigadores han estudiado algas con mecanismos de remoción de mercurio extracelulares. Así, Manuel & Neyra Tanabe (2012) observaron que diferentes especies pertenecientes a los géneros *Scenedesmus*, *Chlorella* y *Oscillatoria* fueron capaces de adsorber mercurio entre un 10-40% de 100 mg/L.

En esta investigación, *S.acutus*, mostró altos índices de remoción para ambos metales (97% de remoción para plomo y 93% de remoción para mercurio). Monteiro y Castro (2012), señalan que la capacidad para absorber metales depende de la composición de la superficie de su pared celular y es promovido por la presencia de grupos funcionales cargados negativamente. La remoción de metales por células microalgales involucra una adsorción pasiva, rápida y reversible sobre la

superficie celular, seguida por un proceso activo lento e irreversible, el cual involucra el transporte de los cationes a través de la membrana celular al interior del citoplasma (Pawlik 2003, Worms, 2006).

El uso de microalgas para el tratamiento de aguas con iones metálicos se presenta como una solución factible, pues ofrecen la ventaja de ser cultivadas con pocos requerimientos de nutrientes para su mantenimiento y desarrollo, por lo anterior, es necesario destacar la

importancia de llevar a cabo estudios que demuestren la aplicación del biotratamiento a nivel de campo. Las microalgas comienzan a jugar un papel cada vez más importante en el tratamiento de aguas contaminadas, sin embargo es necesario profundizar en el estudio de su comportamiento, fisiología, metabolismo, interacción con el ambiente, con el fin de desarrollar un proceso que resulte benéfico para el ecosistema tratado.

Referencias Bibliográficas

- Ahmed S. 2008. The Effects of Some Heavy Metals on Growth and Nutrient Uptake of *Chroococcus Dispersus*. Al-Mustansiriyah Journal of Science. 19(3):17-23.
- Andersen R.A 2005. Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press Books, London. Pp. 40-53.
- Arunakumara K., Z. Xuecheng & X. Song. 2007. Estudio comparativo de la bioacumulación de plomo y cadmio en cianobacterias *Synechocystis sp.* PCC 6803 bajo condiciones de laboratorio. Revista Ciencias Marinas, Universidad autónoma de Baja California Ensenada, Mexico. 33(3): 271- 280.
- Brack A., C. Ipenza, J. Álvarez & V. Sotero. 2011. Minería aurífera en Madre de Dios y contaminación con mercurio: Una bomba de tiempo. Informe preparado por el instituto de la Amazonía Peruana-IIAP y el Ministerio del Ambiente, Lima, Perú. <<http://cdam.minam.gob.pe/novedades/mineriamadrede dios.pdf>>. Acceso 27/09/2016.
- Cobbett C. & P. Goldsbrough. 2002. *Phytochelatins* and

- Manuel, C.D., Neyra-Tanabe, M.E. 2012. Mercury uptake of microalgae in Kematu River, T'boli, South Cotabato, Philippines. Trabajo presentado en la 2da Conferencia internacional y 12 conferencia científica anual, Filipinas.
- Mejía G. 2006. Aproximación teórica de biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia. 1(1): 77-99.
- Meyen F.J.F. 1829. Beobachtungen über einige niedere Algenformen. Nova Acta Physico-Medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Naturae 14: 768-778, pl. XLIII (43).
- Monteiro, C. & Castro, P. 2012. Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. Biotechnology Progress, 28 (2), 299- 311.
- Nakajima A., T. Horikoshi & T. Sakaguchi. 1981. Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems - XVII. Selective accumulation of heavy metal ions by *Chlorella regularis*. European Journal of Applied Microbiology and biotechnology. 12(6): 76-83.
- Novotny V. 1996. Diffuse Sources of Pollution by Toxic Metals and Impact on receiving Waters. En: Heavy Metals; Problems and solutions. Environmental Science Springer- Verlag Berlin, Germany. Pp. 33-52.
- Pawlik- Skowronska, B. (2003). Resistance, accumulation and allocation of zinc in two ecotypes of the Green alga *Stigeoclonium tenue* Kütz, coming from habitats of different heavy metal concentration. Aquatic Botany, 75, 189- 198.
- Richmond A. 2004. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. Oxford, United Kingdom: Blackwell Science. Pp. 345-358.