

**ORIGINAL ARTICLE /ARTÍCULO ORIGINAL**

BIOACCUMULATION OF ARSENIC IN *CHLORELLA VULGARIS* (CHLOROPHYTA: CHLORELLACEAE) IN EFFLUENT FROM INDUSTRIAL PARK RÍO SECO (IPRS) AND ACUTE TOXICITY IN *DAPHNIA MAGNA* (CRUSTACEA: DAPHNIIDAE), AREQUIPA, PERU

BIOACUMULACIÓN DE ARSENICO EN *CHLORELLA VULGARIS* (CHLOROPHYTA: CHLORELLACEAE) EN EFLUENTE DE PARQUE INDUSTRIAL RIO SECO (PIRS) Y TOXICIDAD AGUDA SOBRE *DAPHNIA MAGNA* (CRUSTACEA: DAPHNIIDAE), AREQUIPA, PERÚ

Alex Dueñas¹; Ronald Huarachi¹; Ursulo Yapó¹; Percy Apfata¹ & Rosaura Gonzalez¹

¹Laboratorio de Biología Acuática, Departamento Académico de Biología, Universidad Nacional de San Agustín (UNSA), Av. Alcides Carrión s/n, Arequipa, Perú. E-mail:biologiaacuaticausa@gmail.com

The Biologist (Lima), 2014, 12 (1), jan-jun: 9-22.

ABSTRACT

Bioaccumulation of Arsenic III (As III), was determined in the microalgae *Chlorella vulgaris* in effluent samples from Industrial Park Rio Seco (IPRS) at laboratory scale. Through serial dilutions, a pure microalgae culture was obtained from effluents from the Chilpina treatment station; the resistance was tested through the growth of *C. vulgaris* in flasks of 250 mL with the application of As III in the form of Na₂HAsO₃. The *C. vulgaris* bioaccumulation capacity was tested through chlorophyll “a” concentration and with the residual concentration of As after subjecting the samples from effluents to a flux of 20, 40 and 80 mL·min⁻¹ in a gravity flux system. The toxicity test was done to the effluent sample with the lowest residual concentration of As in the system, through a bioassay where the mortality of *Daphnia magna* neonates “water fleas” and the median lethal concentration (LC₅₀) were tested. The results show an effective diminution of As III by *C. vulgaris*, evidenced for the higher growth in presence of different concentrations of As III compared with the pure culture of *C. vulgaris*. The effective reduction of As was 60.05 % in the effluent samples from IPRS through the gravity flux system to 20 mL·min⁻¹, showing a slight reduction of biomass evidenced by reduction in concentration of chlorophyll “a”, having a 50% of mortality of neonates of *D. magna* after the first 48 h with 3.25 mg·L⁻¹, a lower toxic concentration compared with that reported in other less toxic organic forms.

Keywords: Arsenic, bioaccumulation, *Chlorella*, *Daphnia*, IPRS.

RESUMEN

Se determinó la bioacumulación de Arsénico III (As III) en la microalga *Chlorella vulgaris* en muestras de efluentes de Parque Industrial Río Seco (PIRS), 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 *C. vulgaris*, en matraces de 250 mL con la aplicación de As III en forma de Na_2HAsO_3 . La capacidad de bioacumulación de As de *C. vulgaris* de efluentes del PIRS, se evaluó mediante la concentración de clorofila "a" y mediante la concentración residual de As después de someter a las muestras de efluentes a velocidades de flujo de 20, 40 y 80 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ en un sistema de flujo por gravedad. La evaluación de la toxicidad se realizó para la muestra de efluente que presentó la menor concentración residual de As en el sistema de flujo por gravedad mediante un bioensayo, donde se evaluó la mortalidad de neonatos de *Daphnia magna* "pulga de agua" y se determinó la Concentración Letal Media (CL_{50}). Los resultados demostraron una efectiva disminución de As III por *C. vulgaris*, evidenciada por un mayor crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de As III en comparación con el cultivo puro de *C. vulgaris*. La disminución efectiva de As fue de 60,05% en muestras de efluentes del PIRS, mediante el sistema de flujo por gravedad a la velocidad de flujo de 20 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, mostrando una reducción leve de biomasa evidenciada por la disminución en la concentración de clorofila "a", presentando un 50% de mortalidad de neonatos de *D. magna* a 48 h con 3,25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; concentración menos tóxica en comparación a las reportadas por presentarse una transformación del As en formas orgánicas menos tóxicas.

Palabras claves: Arsénico, bioacumulación, *Chlorella*, *Daphnia*, PIRS.

INTRODUCCIÓN

El arsénico es un metaloide que es considerado como un elemento muy tóxico debido a sus efectos adversos sobre la salud humana (Dessi *et al.* 2006). La Organización Mundial de Salud (OMS) recientemente fijó el límite permisible de arsénico en agua potable a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. En la actualidad, más de 100 millones de personas en todo el mundo están expuestos al arsénico de las aguas subterráneas contaminadas (Satyanarayana *et al.* 2012). Varios métodos fisicoquímicos y biológicos de remediación de arsénico se han reportado y aplicado para tratar el agua para uso humano. Las tecnologías actuales para la eliminación de metales son extremadamente caras o complicadas, especialmente en disoluciones con menos de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de metales (Paknikar *et al.* 1993). Además, estos métodos generan lodos altamente tóxicos y difíciles de tratar

(Ali mohamadi *et al.* 2005). Consecuentemente, urge encontrar nuevas tecnologías o materiales para remover metales. Entre los materiales más promisorios se encuentra la biomasa de algas, ya que es un material abundante, fácil de obtener y presenta sitios ligantes de iones metálicos (Lodeiro *et al.* 2005, Hansen *et al.* 2006, Serrano *et al.* 2011).

La biorremediación microbiana de As de los ambientes acuáticos presenta una opción interesante debido a su alta eficiencia, bajo costo y lo más importante su carácter respetuoso del medio ambiente (Satyanarayana *et al.* 2012). La biorremediación de arsénico se basa en la actividad microbiana para desintoxicar, movilizar o inmovilizar el arsénico a través de oxidación-reducción, biometilación y procesos de complejación (Wang & Zhao 2009). En vista de que el As (III) es altamente tóxico y más

móvil en el ambiente, la mejor estrategia es la biorremediación para convertir el As (III) en menos tóxico y menos móvil (V) (Bahar *et al.* 2013). Posteriormente, el As (V) puede ser inmovilizado en un microorganismo como las algas.

La biorremediación de metales pesados se lleva a cabo a través de biotransformación, bioacumulación, biosorción y biovolatilización (Means & Hincbee 1994, Saqid *et al.* 2013). La bioacumulación de metales pesados se define como la acumulación intracelular de sorbato, que se produce en dos etapas: la primera es idéntica a la biosorción que es rápida y la posterior, más lenta con transporte de sorbato en el interior de las células por un sistema de transporte activo (Chojnacka 2010).

Chlorella vulgaris Beyerinck [Beijerinck], 1890 es un alga verde que, debido a su capacidad de fotosintetizar y a su situación en las cadenas tróficas como productor primario, la convierte en un organismo ideal para acumular metales. 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+} . Este proceso se realiza para incorporar metales a sus células 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, Cd, Pb y Cu, 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. 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 en el metabolismo de la célula (Aksu 2005).

Daphnia magna Straus, 1820 (Crustacea:

Daphniidae), es una especie partenogenética altamente sensible a diferentes sustancias químicas muestras ambientales (Iannacone *et al.* 2012) y es el invertebrado de agua dulce más común y el modelo más usado extensivamente para estudios ecotoxicológicos debido a su alta sensibilidad a sustancias tóxicas, rápida reproducción y corto tiempo de vida (Smutná *et al.* 2014). *D. magna* responde rápidamente cuando es expuesto a condiciones ambientales tóxicas y ocasiona cambios en la actividad metabólica de varias células para sobreponerse al estrés externo (Mager & Kruijff 1995). En estudios anteriores en cultivos de *D. magna* expuestas a As inorgánico mostraron que acumulan en su organismo compuestos como As III, principalmente As V, trazas de monometilarsoniato (MMA) y dimetilarsinato (DMA) (Ohki *et al.* 2002).

En Arequipa, Perú las diversas industrias ubicadas en el PIRS (Parque Industrial 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 Cr, As, Cd y Pb, que repercuten gravemente en la salud humana y en los cultivos de zonas aledañas, cuyos productos cosechados están contaminados con concentraciones elevadas de metales tóxicos como el As. Las lagunas de oxidación de aguas residuales industriales existentes en el Parque Industrial Río Seco son solo paliativos al problema de la contaminación debido a que han demostrado ser inadecuadas e insuficientes, pues se evidencia que están colmatadas y saturadas de Cr (MINAM 2010).

A la fecha no se tienen resultados sobre bioacumulación de As en *C. vulgaris* en efluente de PIRS y resultados ecotoxicológicos agudos de efluentes tratados

en *D. magna*. Por tanto en el presente trabajo el objetivo fue determinar la bioacumulación de As en *C. vulgaris* en un efluente del Parque Industrial río Seco (PIRS) y determinar la toxicidad aguda del efluente tratado sobre *D. magna*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de ejecución

La determinación de toxicidad de los efluentes industriales del PIRS (Parque Industrial río Seco), Arequipa, Perú tratados con *C. vulgaris* y en *D. magna*, se realizaron en el Laboratorio de Biología Acuática de la Universidad Nacional de San Agustín (UNSA), Arequipa-Perú.

La capacidad de biocumulación de As mediante un sistema de flujo por gravedad con *C. vulgaris*, en muestras de efluentes industriales del PIRS se realizó bajo condiciones ambientales en las instalaciones de la Escuela de Biología de la UNSA entre junio y julio de 2013.

Chlorella vulgaris (Chlorophyta: Chlorellaceae), es una microalga que se obtuvo de muestras de agua proveniente de los efluentes de la planta de tratamiento de Chilpina, Arequipa - Perú (71°32'15,93" LO; 16°26'50,76" LS; 2293 msnm). A partir de las muestras colectadas se realizaron diluciones hasta la obtención del cultivo puro de la microalga que se utilizó como inóculo. Se describió a la microalga *C. vulgaris* mediante la observación de sus células en un exámen al fresco y en láminas fijadas a través del microscopio óptico. Además se observaron las características morfológicas coloniales de la microalga. Actualmente esta microalga se encuentra depositada en la colección de Biotecnología de Microalgas de la UNSA (Fig. 1).

Muestreo de efluente del Parque Industrial río Seco (PIRS) Arequipa, Perú

El muestreo de aguas del efluente se realizó en el Parque Industrial río Seco (PIRS) ubicado al Noreste del centro de la Ciudad de Arequipa; distrito Cerro Colorado, Provincia Arequipa, Perú (71°35'59" LO; 16°21'22" LS; 2250 msnm).

Crecimiento de *Chlorella vulgaris* a diferentes concentraciones de As III

Para la evaluación del crecimiento de *C. vulgaris* a diferentes concentraciones de As III, se implementó un ensayo mediante un diseño experimental completamente al azar (DCR), se aplicaron tres concentraciones de Arsénico As III (T1=1,6; T2=3,2 y T3=6,4 mg·L⁻¹) en forma de Na₂HAsO₃, y un grupo control (T) el cual no presentó As, realizándose tres repeticiones por tratamiento. Se utilizaron matraces Erlenmeyer conteniendo un volumen de 250 mL de medio de cultivo sintético para algas (Valiente 1995) que contiene; peptona 292; NaHCO₃ 250; MgSO₄·7H₂O 18; FeSO₄·2H₂O 4; KCl 19; (NH₄)₂SO₄ 382; K₂HPO₄·3H₂O 346; CaCl₂·2H₂O 13 mg·L⁻¹. Las unidades experimentales fueron incubadas a luz a base de un fluorescente blanco-frío a iluminación constante, temperatura de 25°C y aireación constante (Fig. 1). Se tomaron muestras periódicamente cada cinco días por un tiempo de 20 días, para evaluar el recuento de *C. vulgaris* mediante el uso de una cámara de Neubauer y microscopio óptico a 10X (Serrano *et al.* 2011). Para evaluar la bioacumulación de As presente en efluentes del PIRS se implementó un sistema de flujo por gravedad (Fig. 2).

Para el procesamiento de los datos correspondientes al recuento de células de *C. vulgaris* para determinar las diferencias entre tratamientos y diferentes tiempos de evaluación, se empleó la prueba de Tukey, mediante los paquetes estadísticos SPSS versión 20, y GraphPadPrism 6.

Capacidad de bioacumulación de As en sistema de flujo por gravedad en *Chlorella vulgaris*

Para la determinar la capacidad de bioacumulación de As en efluentes industriales del PIRS se realizó DCR, cuyo tratamiento consistió en la aplicación de tres velocidades de flujo de efluentes del PIRS en el sistema de flujo por gravedad, las que fueron: 20 mL·min⁻¹; 40 mL·min⁻¹ y 80 mL·min⁻¹, realizándose tres repeticiones por tratamiento. La Unidad experimental consistió en un sistema de contenedores de plástico de 8 L de volumen, los mismos que presentaban un cultivo inicial de 1,5 L de *C. vulgaris*. Cada contenedor presentaba filtros de grava e interconexiones con mangueras de PVC (policloruro de vinilo) de ½ pulgada de diámetro, en número de seis que conformaban todo el sistema de flujo por gravedad. El sistema estuvo montado en una estructura de melamina a modo de escalones y cada contenedor presentaba un ángulo de inclinación de 9,5°. La muestra de efluentes del PIRS se colocaron en un tanque inicial en un volumen de 5 L, para evitar la saturación de los contenedores. En el tanque inicial se ajustó las velocidades de flujo de los efluentes mediante una llave de paso, midiéndose el volumen por unidad de tiempo y luego se tomaron muestras periódicamente cada cuatro días por un lapso de veinte días, para evaluar la concentración de clorofila "a" y la concentración residual de As (Fig. 2).

Determinación espectrofotométrica de la clorofila "a" de *Chlorella vulgaris* y concentración residual de As

Se tomaron muestras de 100 mL, las cuales se concentraron mediante centrifugación a 8000 rpm x tres min, decantando el sobrenadante y sometándolo a nitrógeno líquido para su lisis, después se resuspendió en un volumen de etanol absoluto hasta cubrir el precipitado que se mantuvo en refrigeración a 4°C en un frasco ámbar por dos días. Al cabo de dos días el extracto se centrifugó por tres min a 8000 rpm

para su clarificación, separando el sobrenadante y anotándose el volumen total del extracto. Posteriormente se transfirió 1,5 mL del extracto clarificado a una cubeta de espectrofotómetro de (1cm) de ancho registrándose la densidad óptica (DO) a 750 nm y 664 nm, enseguida se añadió 0,05 mL de HCl 0,1N agitando con cuidado el extracto acidificado y se registró las absorbancias (DO) a 750 nm y 665 nm, 90 seg después de la acidificación. Restando las absorbancias obtenidas a 750 nm (no-acidificada y acidificada) a las correspondientes lecturas que se obtuvieron a 664 nm antes de acidificar y a 665 nm después de acidificar (la absorbancia registrada a 750 nm es una medida de la turbidez en el extracto). Se utilizaron los valores corregidos (DO 664 nm y DO 665 nm) y se calculó la concentración de clorofila "a" (APHA 1992).

Los efluentes tratados se colectaron periódicamente en un volumen de 250 mL por cada repetición, los cuales se analizaron mediante espectrofotómetro de absorción atómica, para determinar la concentración de As residual después de sometidos a los tratamientos del sistema de flujo por gravedad.

Toxicidad aguda de efluentes industriales del PIRS tratados con *Chlorella vulgaris*, en *Daphnia magna*.

Para la implementación del bioensayo se realizó el cultivo de *D. magna* (pulga de agua) en 20 L de agua reconstituida la cual consta de: 19 L de agua destilada: 2,4 g de MgSO₄; 3,84 g de NaHCO₃ y 0,16 g de KCl, paralelamente se disolvió 2,4 g de CaSO₄·2H₂O en un L de agua destilada y se añadió a los 19 L de la primera solución (Ramírez & Mendoza 2008). Las pulgas de agua cultivadas en agua reconstituida, fueron separadas por edad y solo se utilizaron neonatos entre 0 a 24 h, los que se colocaron 1 día antes del ensayo de toxicidad en número de 10 por envase de vidrio de 300 mL de volumen, conteniendo tres concentraciones del efluente tratado (25% de

efluente: 187,5 mL de agua reconstituida y 62,5 mL del efluente del PIRS tratado; 50% de efluente: 125 mL de agua reconstituida y 125 mL del efluente del PIRS tratado; 75% de efluente; 62,5 mL de agua reconstituida y 187,5 mL del efluente del PIRS tratado), un control negativo con 0% de efluente: agua reconstituida solamente 250 mL y un control positivo con 100% de efluente de PIRS tratado 250 mL.

El efluente del PIRS tratado fue aquel con menor concentración de As residual, después de haber pasado por el sistema modificado de flujo por gravedad. La evaluación de la toxicidad, se realizó mediante el recuento de neonatos muertos por cada unidad de análisis hasta las 48 h. El ensayo se realizó por triplicado.

Se usó el método Probit para la determinación de los valores de Concentración Letal Media (CL_{50}) para la mortalidad en ensayos agudos a 48 h para el efluente del PIRS empleando los paquetes estadísticos SPSS, versión 20 y el software GraphPadPrism 6.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el crecimiento de *C. vulgaris* según concentraciones de As III se observa un incremento en el número de células hasta la 4^{ta} evaluación, presentándose un mayor crecimiento promedio en el tratamiento T3 (6,4 mg·L⁻¹) con 71333,34 organismos/mL, mostrándose también un mayor crecimiento en los tratamientos en comparación con el grupo control (Fig. 3). Se ha tomado como concentración de referencia (3,2 mg·L⁻¹) de Na₂HAsO₃, registrada por Lazo (2009) en la fitoextracción de As, Cr, Cd, Cu, Hg y Pb para la supervivencia y crecimiento de plántulas de *Chenopodium murale* L.; *Baccharis salicifolia* (Ruíz & Pavón) Pers.; *Eleocharis*

montevidensis Kunth y *Tessaria integrifolia* Ruiz y Pavon, por ser el antecedente más próximo en investigaciones realizadas para nuestro medio con As III. En la figura 3 se detalla un aumento progresivo en el recuento de *C. vulgaris* hasta la última evaluación y más aún con la mayor concentración de As III (6,4 mg·L⁻¹). Estos resultados sugerirían la transformación progresiva de una forma tóxica de As como es la de As 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, debido a la presencia de más superficie de absorción, y a que las algas que se mueven libremente por el medio, retienen una mayor cantidad de metales que las algas fijas a un sustrato (Xianhai et al. 2012).

Se muestra la presencia de dos grupos (a y b) según la prueba de comparación múltiple de Tukey, siendo el tratamiento T3 (6,4 mg·L⁻¹), el que presentó mayor crecimiento de *C. vulgaris* seguido de los tratamientos T1 y T2, siendo el grupo control el que presentó un menor crecimiento promedio (Fig. 4). En el proceso de bioacumulación 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⁻¹) de microalgas que se mueven libremente por el medio retienen una mayor cantidad de metales que las algas fijas a un sustrato, 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⁻¹), evidenciado en la remoción y evaluación de la toxicidad de Cu y Fe mediante células libres e inmovilizadas de *Anabaena doliolum* Bharadwaja 1935 y *C. vulgaris* (Rai & Mallick 1992). La máxima densidad en presencia de (6,4 mg·L⁻¹) de As III es muy próxima a una alta densidad (5×10^5 organismos·mL⁻¹). Este resultado explicaría la bioacumulación de As, la misma que es medida indirectamente por el crecimiento de *C. vulgaris* en presencia de As

III.

Para la concentración de clorofila “a” en un sistema de flujo por gravedad con *C. vulgaris* se muestra la presencia de tres grupos (a, b y c) según la prueba de comparación múltiple de Tukey, siendo el cultivo puro de *C. vulgaris* el que presentó una mayor concentración de clorofila “a” con un promedio de $153,85 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ seguido de la concentración de clorofila “a” sometida a $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ en el sistema de flujo por gravedad con un promedio de $81,52 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$, siendo las velocidades de flujo de 40 y $80 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ las que presentaron menor concentración promedio de clorofila “a” con $36,74$ y $40,18 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$, respectivamente (Fig. 5) observándose que cuando la producción del pigmento fotosintético disminuye significativamente con respecto al valor promedio del cultivo puro de *Chlorella*, se mantienen valores que permiten inferir una viabilidad celular aún en presencia de As; lo que demuestra la resistencia de *C. 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 clorofila y carotenos, reportando 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* (Dunal) Teodoresco 1905 cultivada a baja iluminación y preadaptada a diferentes salinidades (Marin *et al.* 1998).

La concentración de clorofila “a” disminuye conforme aumenta la velocidad de flujo en el sistema de flujo por gravedad (Fig. 5), indicando un aumento de biomasa al aumentar la velocidad de flujo, puesto que una menor velocidad de flujo indicaría un mayor tiempo de retención en el sistema de flujo, tiempo en el que se daría la reposición de la biomasa, la mayor concentración de clorofila “a” ($81,52 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ó $0,08152 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) es menor a $0,2010 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Marcano *et al.* 2010). En la evaluación

de los cambios ultraestructurales de adaptación de la microalga *Scenedesmus* sp. al estrés inducido por Cd y V, se ha demostrado un mayor efecto del As en la biomasa de la microalga *C. vulgaris* que ocasionado por Cd y V en la microalga *Scenedesmus* sp., probablemente debido a mayores alteraciones en la organización de los cloroplastos (Fernández & Novillo 1996).

La concentración residual de As de efluentes industriales del PIRS (Parque industrial río Seco) mediante un sistema de flujo por gravedad con *C. vulgaris* muestra la presencia de dos grupos (a y b) según la prueba de comparación múltiple de Tukey, siendo menor la concentración de As residual de efluentes del PIRS después de ser sometido a un sistema de flujo por gravedad a la velocidad de flujo de $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ con $443 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en promedio, mientras que la concentración de los efluentes tratados a 40 y $80 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ no presentaron diferencias estadísticas con los efluentes sin ser sometidos al sistema de flujo por gravedad (Fig. 6). La mayor bioacumulación de As de efluentes del PIRS se presentó a la velocidad de flujo de $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (Fig. 7), presentándose una concentración de As libre residual promedio de $4,43 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; resultando esta velocidad como la más eficiente en la remoción de As y siendo este el menor flujo utilizado a diferencia de lo descrito por Almaguer *et al.* (2010) en la evaluación de la bioacumulación de Pb en una columna empacada con biomasa inmovilizada, en la que señalan que la velocidad de absorción de Pb II fue mayor utilizando un flujo volumétrico de $60 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ en comparación al de $40 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ por presentar poca resistencia del complejo inmovilizado, a un mayor tiempo de contacto entre el biosorbente y el ión metálico y al de $80 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 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 As por parte de la microalga *C. vulgaris* a mayores tiempos de contacto a

este metal. Además, si se considera un corto tiempo de contacto de la microalga con As, no se realizará una absorción óptima del metal.

La disminución de As de efluentes industriales del PIRS (Parque industrial río seco) mediante un sistema de flujo por gravedad con *C. vulgaris*. muestra la disminución porcentual de As de efluentes industriales del PIRS, después de ser sometidos al sistema de flujo por gravedad a 20; 40 y 80 mL·min⁻¹, mostrándose la mayor disminución de As de efluentes del PIRS a la velocidad de 20 mL·min⁻¹ en el sistema de flujo por gravedad con 60,05 %, seguido del 23,72 % de disminución obtenido a la velocidad de 40 mL·min⁻¹ en el sistema de flujo por gravedad, mientras que la menor disminución se obtuvo a la velocidad de 80 mL·min⁻¹ con 6,94 % de As presente en los efluentes del PIRS. Además el modelo que describe la disminución porcentual de As indica que si la velocidad de flujo aumenta en 1 mL·min⁻¹, el As disminuye en 0,82% (Fig. 7). La mayor remoción de As 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⁻¹ similar a la obtenida en la evaluación de la captación de Cd por biomasa libre e inmovilizada de *Nostoc minutum* Desmazières ex Bornet & Flahault 1886 (Ferrari et al. 2004), en la que al partir de una concentración inicial de Cd de 10 mg·L⁻¹ 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 *C. 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 registra una remoción del 70% de As en la reducción de los niveles de As en el agua tratada con TiO₂ (Dessi et al. 2006); sin embargo los efectos de la sobre-exposición al polvo de TiO₂ causan tirantez y dolor de pecho, tos y dificultad para respirar. El contacto con la piel y los ojos puede provocar irritación, efectos que se presentan como perjudiciales

para realizar un sistema de remoción mediante este sistema, a pesar de no ser muy distante del porcentaje de remoción de As mediante esta forma con el obtenido.

La toxicidad aguda de los efluentes industriales del PIRS tratados con *C. vulgaris*, muestra en *D. magna* una CL₅₀ a las 48 h e indica que con 3,25 mg·L⁻¹ de efluente tratado en el sistema de flujo por gravedad se obtiene el 50% de mortalidad de neonatos de *D. magna*. Se muestra también la mortalidad de neonatos por cada concentración de efluente tratado (Tabla 1), así mismo el modelo matemático de la distribución Probit permite pronosticar la concentración para cualquier porcentaje de mortalidad. La CL₅₀ (3,25 mg·L⁻¹) presenta un valor mucho mayor que la toxicidad del arseniato en algas, *Daphnia* y pez mosquito, (Jureswicz & Buikema 1980) en la que CL₅₀-24h del As III sobre *Daphnia pulex* Leydig, 1860 y *D. magna* fluctúa entre 1,0 y 5,2 µg·L⁻¹, y también por la reportada en la evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de Cu, Zn y As sobre *Daphnia obtusa* Kurz 1874 (Gaete & Chávez 2008), en que la toxicidad del As fue en forma de As₂O₃ (As III) y se obtuvo una CL₅₀-24h de 6,1 µg·L⁻¹. Estos resultados demostrarían la menor toxicidad de los efluentes del PIRS tratados mediante el sistema de flujo por gravedad a 20 mL·min⁻¹, debido a que presenta un 50% de mortalidad con una mayor concentración de As residual. Esto se explicaría por la presencia de As en formas orgánicas dominantes menos tóxicas, como el ácido dimetilarsínico [DMAA, (CH₃)₂AsO(OH)] y el ácido monometilarsónico [MMAA, CH₃AsO(OH)₂] por efecto de la *C. vulgaris*, donde el As está presente en ambos casos como As V (Torralba 1996), mientras que en las investigaciones reportadas anteriormente se evalúa la toxicidad de As directamente como As III, su forma más biotóxica.



Figura 1. Cultivo e incubación de *Chlorella vulgaris*. **a.** Cultivo de *C. vulgaris*; **b.** Incubación a temperatura, aireación e iluminación constantes de las unidades experimentales en la evaluación del crecimiento de *C. vulgaris* a diferentes concentraciones de As III.

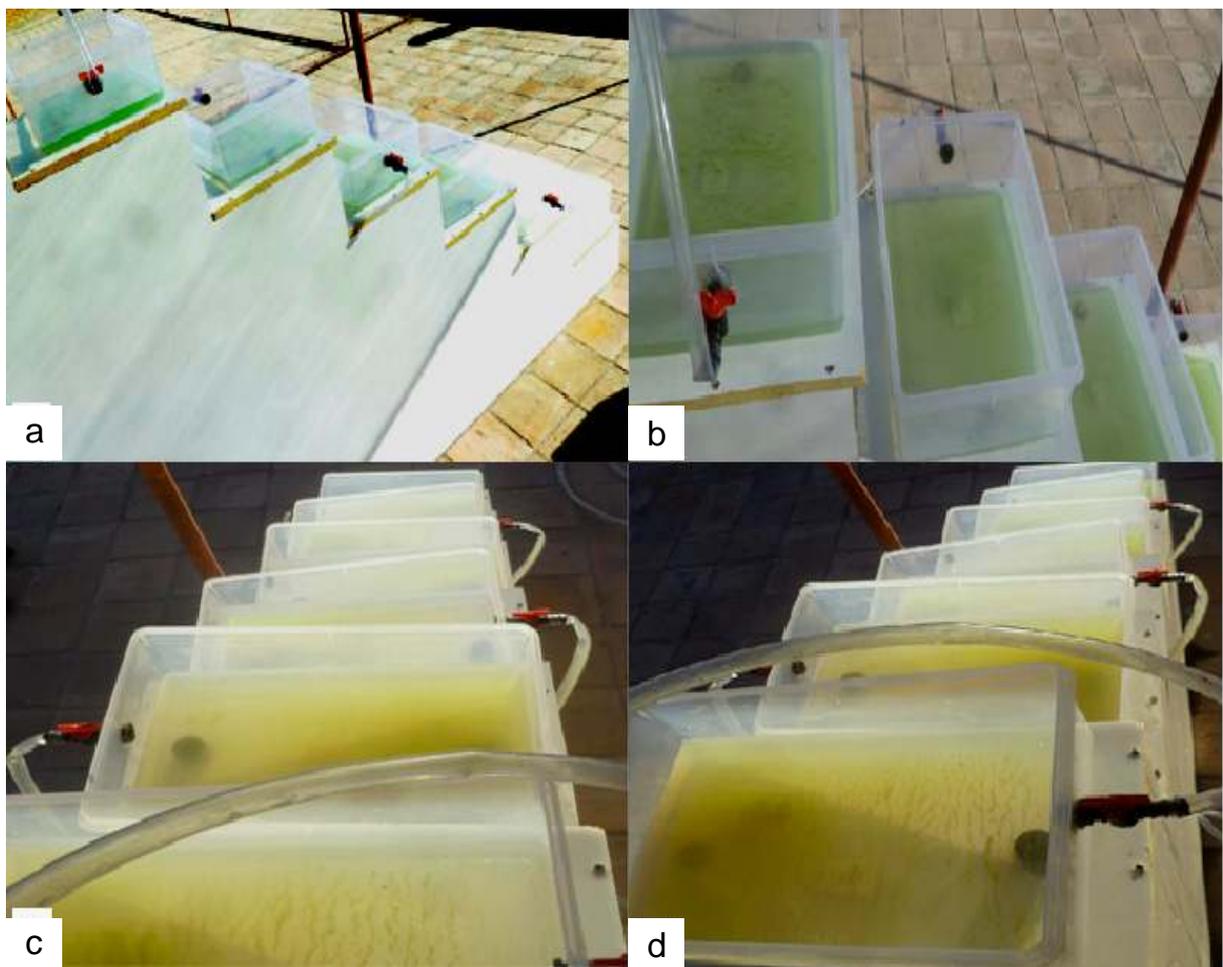


Figura 2. Sistema de flujo por gravedad a diferentes velocidades de flujo con *Chlorella vulgaris*. **a.** cultivo inicial de 1,5 L de *C. vulgaris* por bandeja. **b.** efluente del PIRS tratado en el sistema de flujo por gravedad a $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. **c.** $40 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. **d.** $80 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

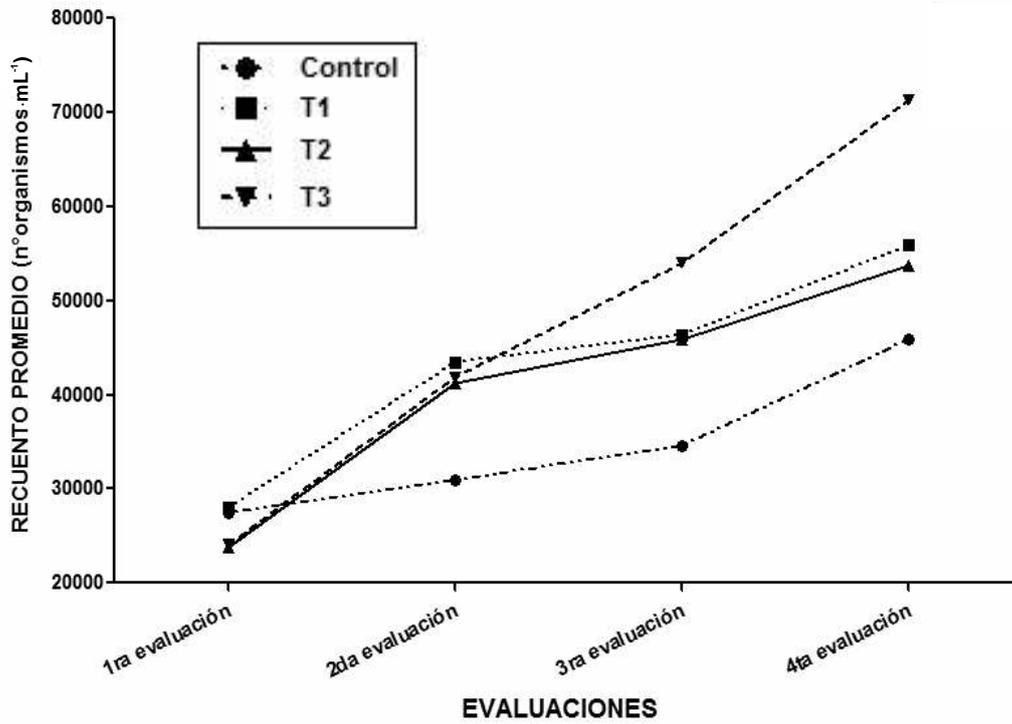


Figura 3. Crecimiento de *Chlorella vulgaris* según concentraciones de As III.

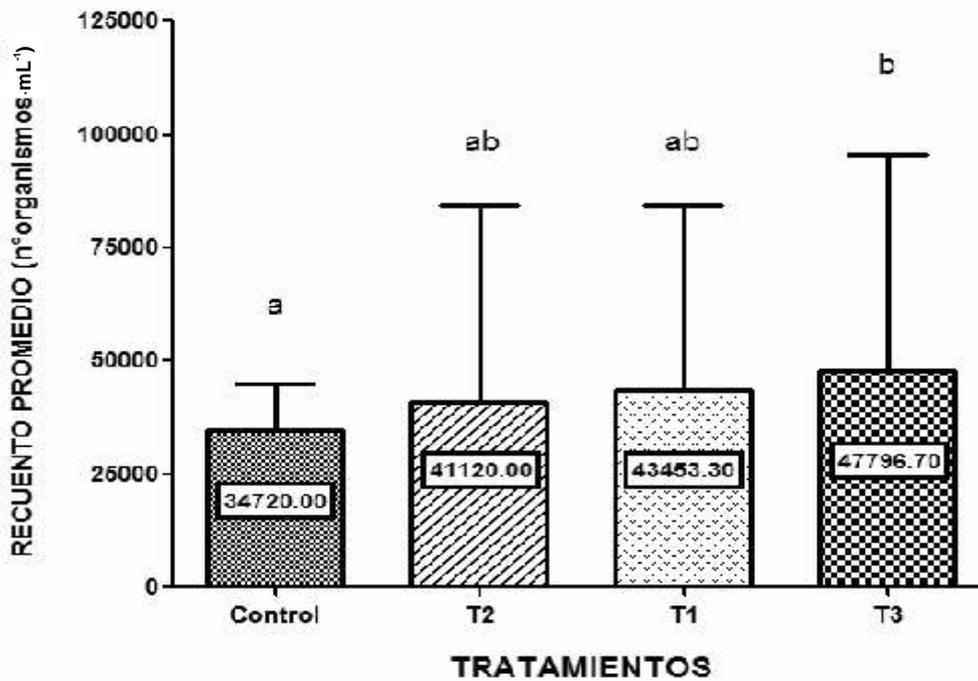


Figura 4. Prueba de comparación múltiple para el crecimiento promedio de *Chlorella vulgaris* en diferentes concentraciones de As III.

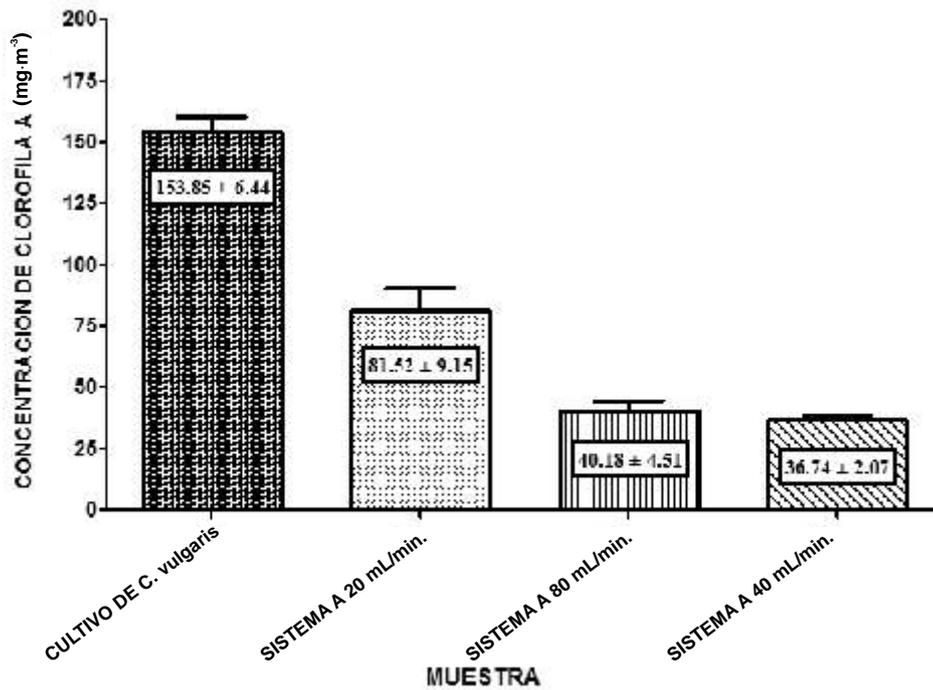


Figura 5. Prueba de comparación múltiple para la concentración de clorofila “a” en un sistema de flujo por gravedad con *Chlorella vulgaris*, en efluentes industriales del PIRS.

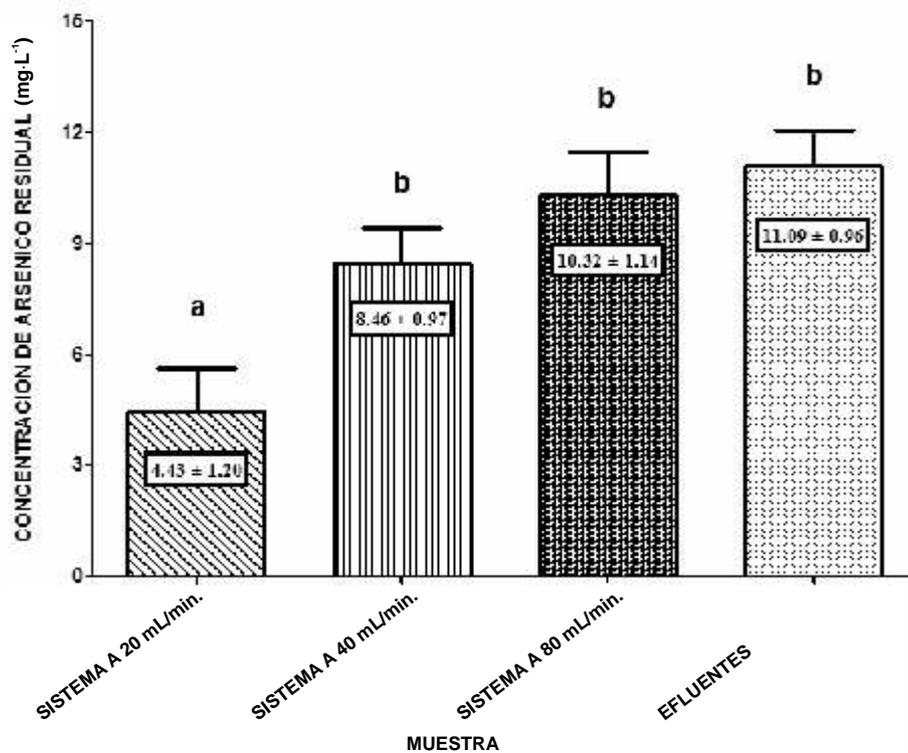


Figura 6. Prueba de comparación múltiple para la concentración residual de arsénico de efluentes industriales del PIRS mediante un sistema de flujo por gravedad con *Chlorella vulgaris*.

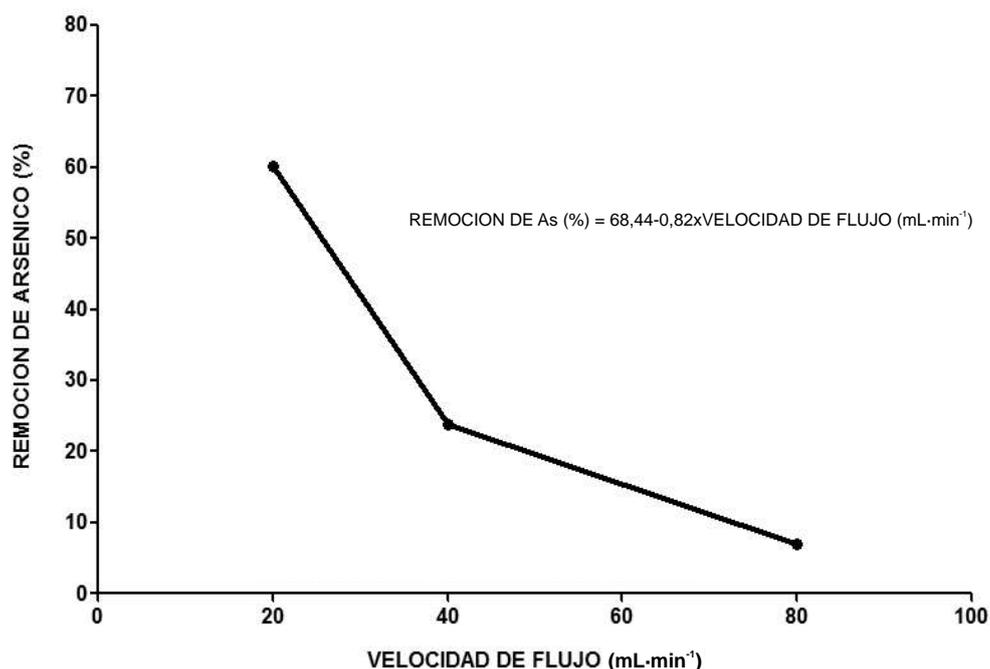


Figura 7. Disminución de arsénico de muestras de efluentes industriales de PIRS (Parque industrial río seco) en un sistema de flujo por gravedad con *Chlorella vulgaris*.

Tabla 1. Evaluación de la mortalidad de neonatos de *Daphnia magna* “pulga de agua” a 48 h de sometidos a un efluente tratado en un sistema de flujo por gravedad a 20 mL·min⁻¹.

Concentración del (efluente)(%)	concentración de arsénico (mg·L ⁻¹)	Mortalidad (%)
0	0,00	0,00
25	1,11	20,00
50	2,22	20,00
75	3,32	60,00
100	4,43	80,00

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alimohamadi, M.; Abolhamd, G. & Keshtkar, A. 2005. Pb(II) and Cu (II) Biosorption on *Rhizopus arrhizus* modeling mono and multi-component systems. Minerals Engineering, 18:13-14.
- APHA. 1992. *Standard methods for the examination of water and wastewaters*. 18^{va} Ed. American Public Health Association. Washington, DC.
- Aksu, Z. 2005. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. Process Biochemistry, 40:997-1026.
- Almaguer, V.; Garza, T. & Rivera J. 2010. Bioadsorción de Pb²⁺ en una columna empacada con biomasa inmovilizada. Ingenierías, 9: 13-17.
- Bahar, M.; Megharaj, M. & Naidu, R. 2013. Bioremediation of arsenic-contaminated water: Recent advances and future prospects. Water, Air & Soil Pollution,

- 224: 1-20.
- Chojnacka, K. 2010. Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. *Environmental International*, 36: 299-307.
- Dessi, J.; Ormeño, M.S. & Rios, D.E. 2006. Reducción de los niveles de arsénico en el agua tratada con TiO_2 . Boletín informativo. QuimiNet. Santa Cruz, Argentina, 1-6. http://www.produccion-animal.com.ar/agua_bebida/145-Reduccion_arsenico.pdf leído el 10 diciembre del 2013.
- Ferrari, S.; Guzmán, G.; Silva, P.; Alcaráz, L.; Silva, H. & González, D. 2004. Captación de cadmio por biomasa libre o inmovilizada de *Nostoc minutum* (Cianobacteria filamentosa). *Acta Toxicológica Argentina*, 12:19-22.
- Fernández, L. & Novillo, A. 1996. Toxicity and bioaccumulation of cadmium in *Olithodiscus luteus* (Raphidophyceae). *Water Review*, 30:57-62.
- Gaete, H. & Chávez, C. 2008. Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1874) (Cladocera, Crustacea). *Limnetica*, 27:1-10.
- Hansen, H.; Ribeiro, A. & Mateus, E. 2006. Biosorption of Arsenic(V) with *Lessonia nigrescens*. *Minerals Engineering*, 19:486-490.
- Iannacone, J.; Alvarino, L.; Paredes, C. & Ayala, H. 2012. Toxicidad aguda y crónica de la quinoleína fenólica sobre la pulga del agua *Daphnia magna*. *The Biologist (Lima)*, 10: 24-33.
- Jurewicz, S. & Buikema, A. 1980. Effects of arsenate on algae, *Daphnia*, and mosquito fish. *Virginia Journal of Science*, 31:124.
- Lazo, H. 2009. 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. CONCYTEC. Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú.
- Lodeiro, P.; Cordero, B.; Barriada, J.; Herrero, R. & Sastre de Vicente, M. 2005. Biosorption of cadmium by biomass of brown marine macroalgae. *Bioresource Technology*, 96: 1796-1803.
- Mager, W. & De Kruijff, A. 1995. Stress-induced transcriptional activation. *Microbial Reviews*, 59: 506-531.
- Marcano, L.; Carruyo, I.; Morales, C.; Montiel, X. & Moreno, P. 2010. Evaluación de los cambios ultraestructurales de adaptación de la microalga *Scenedesmus* sp al estrés inducido por cadmio y vanadio (Cd y V). *Acta Microscópica*, 19:214-220.
- Marin, N.; Morales, F.; Lodeiros, C. & Tamigneaux, E. 1998. Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. *Journal of Applied Phycology*, 10:405-411.
- Means, J. & Hinchey, R. 1994. *Emerging technology for bioremediation of metals*. Lewis Publishers, Ohio, USA. 160 p.
- MINAM (Ministerio del Ambiente). 2010. *Mypes del sector curtiembre se capacitan en gestión ambiental rentable*. En: <http://www.minam.gob.pe>. Leído el 5 de diciembre de 2012.
- Ohki, A.; Nakajima, T. & Maeda, S. 2002. Studies on the accumulation and transformation of arsenic in freshwater organisms II. Accumulation and transformation of arsenic compounds by *Tilapia mossambica*. *Chemosphere*, 46:325-331.
- Paknikar, K.; Palnitkar, U. & Puranik, P.R. 1993. Biosorption of metals from solution by micelial waste of *Penicillium chrysogenum*. pp. 229-235. Torma, A.E.; Apel, M.L. & Brierley, C.L. (Ed.). *Biohydrometallurgical Technologies*.
- Ramirez, P. & Mendoza, A. 2008. *Ensayos*

- toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo.* SEMARNAT. Mexico D.F. 407 p.
- Rai, L. & Mallick, N. 1992. 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, 8:110-114.
- Satyanarayana, T.; Prakash, A. & Narain, J.B. 2012. *Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment*. Springer. India. 815 p.
- Saqib, A.N.S.; Waseem, A.; Khan, A.F.; Mahmood, Q.; Khan, A.; Habib, A. & Khan, A.R. 2013. Arsenic bioremediation by low cost materials derived from Blue Pine (*Pinus wallichiana*) and Walnut (*Juglans regia*). Ecological Engineering, 51: 88-94.
- Serrano, L.; Sierra, E.; Álvarez, C.; Narváez, P.; Ramírez, D.; Scott, Ó.; Torres, J. & Godoy, R. 2011. Efecto del hierro en el crecimiento y acumulación de lípidos en la microalga colombiana *Chlorella vulgaris* Laun 0019. Iteckne, 8:15-22.
- Smutná, M.; Jarque, S.; Hilscherová, K.; Maršálek, B.; Haeba, M.; Bláha, L. 2014. Acute, chronic and reproductive toxicity of complex cyanobacterial blooms in *Daphnia magna* and the role of microcystins. Toxicon, 79: 11-18.
- 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.* Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 234 p.
- Valiente, V. 1995. *Compendio de medios de cultivos, soluciones y extractos para microalgas y cianobacterias.* CNIC. 1^{ra} Ed. Cuba.
- Wang, S. & Zhao, X. 2009. On the potential of biological treatment for arsenic contaminated soils and groundwater. Journal of Environmental Management, 90: 2367-2376.
- Xianhai, Z.; Danquah, M.; Halim, R.; Yang, S.; Dong, X. & Lu, Y. 2012. Comparative physicochemical analysis of suspended and immobilized cultivation of *Chlorella* sp. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 88:247-254.

Received December 14, 2013.

Accepted February 25, 2014.