




<https://doi.org/10.15517/rev.biol.trop..v73iS1.64045>

## Estudio preliminar sobre la capacidad de remoción de arsénico por las microalgas nativas de Costa Rica *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* (Chlorophyceae)

Ana Margarita Silva-Benavides<sup>1,2 \*</sup>;  <https://orcid.org/0000-0001-9006-9391>

Natalia Jiménez-Conejo<sup>2</sup>;  <https://orcid.org/0009-0000-6808-4966>

Catalina Solís-Calderón<sup>3</sup>;  <https://orcid.org/0000-0002-7896-9474>

Betzabel Arias Barrantes<sup>3</sup>;  <https://orcid.org/0000-0001-6946-5453>

1. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica; [ana.silva@ucr.ac.cr](mailto:ana.silva@ucr.ac.cr)
2. Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica; [natalia.jimenezconejo@ucr.ac.cr](mailto:natalia.jimenezconejo@ucr.ac.cr)
3. Laboratorio Nacional de Aguas, Área de Microbiología, Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados, Costa Rica, 30306; [csolis@aya.go.cr](mailto:csolis@aya.go.cr), [bearias@aya.go.cr](mailto:bearias@aya.go.cr)

Recibido 05-X-2024. Corregido 24-X-2024. Aceptado 17-II-2025.

### ABSTRACT

#### Preliminary study on the arsenic removal capacity of native Costa Rican microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* (Chlorophyceae)

**Introduction:** The accumulation of heavy metals, such as arsenic, in aquatic ecosystems may lead to significant ecological and health issues, disrupting environmental stability and potential risks to human, plant, and animal health. Phytoremediation, particularly using microalgae as bioremediation, offers a promising approach to address these pollution challenges.

**Objective:** This study aimed to evaluate the arsenic removal capacity of two green microalgae species, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*.

**Methods:** Both species were collected from water sources in Vuelta de Kooper ASADA 5, Aguas Zarcas, San Carlos. Initial strains of *C. vulgaris* and *S. dimorphus* were grown in BG11 culture medium under controlled light and temperature conditions. The biomass from each culture was resuspended in water samples from the ASADA in Aguas Zarcas (with known Arsenic concentration), and some reagents from the BG11 medium. Experimental treatments were conducted for 8 and 13 days for *C. vulgaris*, and 12–13 days for *S. dimorphus*, with a control treatment. The total chlorophyll concentration, temperature, and pH were monitored.

**Results:** The results demonstrated a significant capacity for arsenic removal. *C. vulgaris* obtained an average arsenic removal of 20.51 % after 8 days of treatment and 31.67 % after 13 days. After 13 days of treatment, *S. dimorphus* showed an average arsenic removal of 47.19 %. According to bioaccumulation, both species exhibited bioaccumulation percentages greater than 97 %.

**Conclusion:** The arsenic removal and bioaccumulation data have demonstrated the potential of *C. vulgaris* and *S. dimorphus* as promising candidates for the phytoremediation of arsenic-contaminated waters.

**Key words:** bioremediation; heavy metals; aquatic pollution; green microalgae.



## RESUMEN

**Introducción:** La acumulación de metales pesados, como el arsénico, en los ecosistemas acuáticos puede causar serios problemas a los organismos vivos, perjudicando la estabilidad del ambiente, representando una amenaza para la salud humana, plantas y animales. Estos problemas de contaminación pueden ser parcialmente resueltos mediante procesos de fitorremediación utilizando microalgas como organismos biorremediadores.

**Objetivo:** Evaluar la capacidad de remoción del arsénico de dos microalgas verdes, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus*.

**Métodos:** Ambas especies fueron recolectadas y aisladas de las fuentes de agua de Vuelta de Kooper Asada 5, de Aguas Zarcas de San Carlos. Los inóculos iniciales de *C. vulgaris* y *S. dimorphus* fueron cultivados en medio nutritivo BG11 bajo condiciones controladas de luz y temperatura. Posteriormente, la biomasa obtenida en cada uno de los cultivos fue resuspendida en muestras de agua de la ASADA de Agua Zarcas con una concentración de arsénico conocida y algunos reactivos del medio BG11. Se realizaron ensayos de 8 y 12–13 días para *C. vulgaris* y de 12–13 días para *S. dimorphus*, con un tratamiento control sin biomasa. Se monitoreó la concentración de clorofila total, temperatura y pH.

**Resultados:** Los resultados demuestran una notable capacidad de remoción de arsénico; donde *C. vulgaris* alcanzó un porcentaje promedio de remoción de un 20.51 % para 8 días de tratamiento y 31.67 % en 13 días. Por otra parte, durante 13 días de tratamiento *S. dimorphus* presentó un porcentaje de remoción de arsénico promedio en el medio de un 47.19 %. En cuanto la bioacumulación, ambas especies mostraron un porcentaje de bioacumulación mayor a 97 %.

**Conclusión:** Los porcentajes de remoción de arsénico en el medio su acumulación en la biomasa destaca el potencial uso de *C. vulgaris* y *S. dimorphus* como especies candidatas para el tratamiento de aguas contaminadas.

**Palabras clave:** biorremediación; metales pesados; contaminación acuática; microalgas.

## INTRODUCCIÓN

Entre los organismos utilizados en biorremediación destacan las microalgas, que se caracterizan por su rápido crecimiento y su capacidad de incorporar metales pesados. Debido a su alta tolerancia y tasa de absorción pueden ser usadas como indicadores biológicos debido a su alta sensibilidad a los cambios en el ambiente y la capacidad de detectar los efectos tóxicos de los metales pesados. Esta alta tolerancia se debe principalmente a la capacidad de las microalgas de desarrollar mecanismos de tolerancia capaces de reducir los efectos adversos que les pueden producir estos metales (Arica et al., 2005; Bozeman et al., 1989; Kaplan, 2013; Kumar et al., 2015; Kumar et al., 2019; Leong & Chang, 2020; Lomax et al., 2012; Monteiro et al., 2012; Perales-Vela et al., 2006; Radix et al., 2000; Suresh & Ravishankar, 2004).

Algunas de las microalgas usadas en la remoción de metales y metaloides como vanadio, arsénico y níquel son las algas verdes *Chlorella* sp., *Chlamydomonas* sp., *Desmodesmus pleiomorphus* y *Scenedesmus* sp. (Alharbi et al.,

2023; Awasthi et al., 2018; De-Bashan & Bashan, 2010; Xu et al., 2024), las cuales han mostrado resultados favorables en la remoción y bioacumulación de metales pesados, considerándose alternativas eficientes, rentables y sostenibles (Leong & Chang, 2020; Pacheco et al., 2015). Estudios realizados por Jiang et al., (2011) han cuantificado un 70 % de remoción de arsénico ( $As^{+5}$ ) en el agua utilizando la microalga *Chlorella vulgaris*; Qiao et al., (2024) destacan la eficiencia en adsorción de cadmio (9 000 mg/kg) de la microalga *Scenedesmus acuminatus*, Arora et al., (2017), resaltan los beneficios del uso de microalgas de los géneros *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. debido a su capacidad de biotransformar metales pesados y metaloides como el arsénico en moléculas químicas con menor toxicidad; reduciendo de esta manera el riesgo de contaminación en los ecosistemas.

En Costa Rica, la contaminación en aguas superficiales debido a la presencia de arsénico es una problemática que afecta a las Asociaciones de Acueducto Rural Comunitarios (ASADAS) en distintos cantones de las provincias de Guanacaste y Alajuela (Instituto

Costarricense de Acueductos y Alcantarillados [AyA], (2016), cuyo origen proviene principalmente de aguas subterráneas provocadas por fallas geológicas localizadas en las zonas afectadas (Arias-Barrantes, 2020; García & Azofeifa, 2020). Debido a la problemática presente en la calidad del agua, el riesgo en la salud humana y daños en el ecosistema causadas por la presencia de arsénico en altas concentraciones, el presente estudio evaluó la capacidad de remoción de este metaloide por parte de dos microalgas *Chlorella vulgaris* ( Beijerinck, 1890) y *Scenedesmus dimorphus* (Kützing, 1834) en condiciones de laboratorio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislamiento e identificación de las microalgas:** Las muestras de microalgas fueron colectadas en las tomas de agua de la naciente vuelta Kooper Aguas Zarcas perteneciente a la Asada de Vuelta Kooper, Agua Zarcas, San Carlos, Alajuela, Costa Rica (10°28'38"N y 84°22'12" W). Posteriormente, las microalgas fueron aisladas en el laboratorio en cajas de Petri con agar en medio nutritivo. Colonias unialgales de cada especie se inocularon en medio nutritivo estéril. Las microalgas se identificaron morfológicamente mediante un microscopio de luz (Nikon®, Eclipse) como *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus*. Una vez identificadas fueron aisladas y cultivadas en medio BG11 (Rippka et al., 1979). Actualmente, las cepas forman parte de la colección del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Cianobacterias (LABIOMIC), Centro de investigación en Ciencias del Mar y Limnología (CIMAR), Universidad de Costa Rica.

**Escalamiento de cultivos:** *C. vulgaris* y *S. dimorphus* fueron cultivadas en condiciones unialgales en medio BG11 (Rippka et al., 1979). Cada uno de los cultivos se mantuvieron a temperatura constante entre 28–30 °C, con aireación durante 10–12 días hasta que el crecimiento alcanzó la fase exponencial (Touloupakis et al., 2021).

## Diseño experimental:

**Agua de la toma de agua de la ASADA Vuelta Kooper Agua Zarcas:** se tomaron muestras de agua de este sitio y se cuantificó la concentración de arsénico mediante el empleo de equipo de espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (Agilent Technologies 7700x ICP-MS por sus siglas en inglés), de acuerdo con los requisitos del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (American Public Health Association, American Water Works Association, & Water Environment Federation, 2023). La verificación de parámetros de desempeño y la calibración de masas se siguió lo indicado en el manual del fabricante.

La concentración inicial del arsénico en el medio de cultivo de las microalgas correspondió a  $48.64 \pm 3.6 \mu\text{g/L}$ . Esta agua se usó en los experimentos con cada especie de microalga. Los controles consistieron en un volumen de 500 ml de medio de cultivo con arsénico sin biomasa y otro volumen de medio de cultivo BG11 con biomasa, pero sin arsénico.

**Crecimiento de los cultivos:** Los inóculos iniciales de *C. vulgaris* y *S. dimorphus* crecieron en el medio nutritivo BG11 (Rippka et al., 1979). Cuando alcanzaron la fase exponencial de crecimiento, la biomasa se centrifugó a 8 000 rpm durante cinco minutos y se colectó. La biomasa de cada microalga se lavó tres veces con agua destilada y se resuspendió en 500 ml con agua proveniente de la toma de agua de Aguas Zarcas. La concentración inicial de clorofila total en cada tratamiento correspondió a un promedio de 20 mg/L clorofila total.

Durante el crecimiento de los tratamientos, se utilizó una fuente de luz artificial blanca con una intensidad de 200  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^2/\text{s}$  y una temperatura constante de 28°C. Cada cultivo se agitó con una mezcla de aire y  $\text{CO}_2$  (97/3 v/v). El pH se midió cada 24 horas. La concentración de clorofila (mg/L) se cuantificó según el protocolo de Vohra, (1966) al inicio, durante la fase de crecimiento exponencial y al final del crecimiento de cada experimento. En el caso



del tratamiento realizado con la microalga *C. vulgaris* se realizaron cinco ensayos: dos con un crecimiento de 8 días y tres ensayos correspondientes a un crecimiento de 12–13 días, al final de este periodo se observó una disminución de la concentración de clorofila. Para la microalga *S. dimorfus* se realizaron ensayos de 12–13 días por triplicado. Cada uno de los experimentos se realizaron bajo las mismas condiciones iniciales de concentración de clorofila, temperatura e intensidad lumínica y su respectivo tratamiento control.

*Contenido de arsénico en el medio nutritivo de crecimiento de las microalgas:* Se cuantificó el contenido de arsénico en el medio líquido al inicio y al final de cada uno de los experimentos. Para ello, el cultivo de 500 ml fue centrifugado a 8 000 rpm para coleccionar el sobrenadante que fue filtrado utilizando filtros de fibra de vidrio Whatmann de 47 mm de diámetro. Posteriormente, se realizó una digestión de las muestras del sobrenadante por triplicado y se cuantificó el contenido de arsénico presente ( $\mu\text{g/L}$ ) mediante la técnica ICP-Masas (Llorente-Mirandes et al., 2010; Rubio et al., 2010), (Agilent 7500 cx, Germany). Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Química de Acueductos y Alcantarillados (AyA) siguiendo el protocolo de Agilent Technologies, (2011).

*Cuantificación de arsénico en la biomasa:* Se realizó un análisis del contenido de arsénico de las microalgas en la biomasa inicial y final de cada uno de los experimentos. La cuantificación del contenido de arsénico en la biomasa se realizó en el laboratorio de Suelos y Foliars del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA), de la Universidad de Costa Rica. La muestra se liofilizó, se secó en la estufa a 80 °C y se filtró por criba de 1 mm. Se pesaron 0.5 g de la muestra y se realizó una digestión húmeda con ácido nítrico concentrado ultrapuro (Kalra, 1998). Posteriormente, se cuantificó el contenido de arsénico ( $\mu\text{g/g}$ ) por triplicado en cada una de las muestras mediante espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) (Kalra, 1998).

**Análisis estadístico:** Para analizar la tasa de crecimiento de la biomasa de las microalgas y evaluar la remoción de arsénico en el agua, se realizaron modelos lineales de efectos mixtos donde las variables independientes fueron la concentración de clorofila ( $\text{mg/L}$ ) y la concentración de arsénico ( $\mu\text{g/L}$ ). Los factores fijos incluidos fueron experimentos (control, *C. vulgaris* y *S. dimorfus*). Cada día de crecimiento y el número de experimentos fueron considerados como factores aleatorios. Para evaluar la bioacumulación de arsénico en la biomasa al inicio y al final de los tratamientos, se realizó una prueba T-student analizando los promedios de la concentración ( $\mu\text{g/g}$ ) de arsénico presente en la biomasa seca antes y después de los ensayos. Estos análisis se realizaron utilizando el programa estadístico R versión 3.4.0 (R Core Team, 2024).

## RESULTADOS

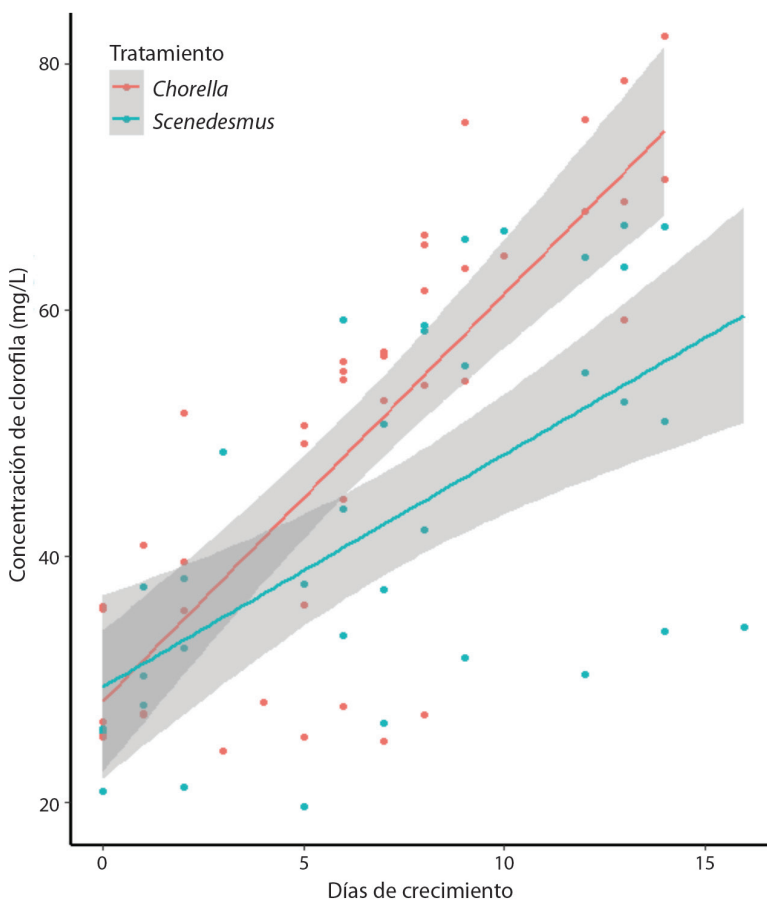
**Crecimiento del cultivo (contenido de clorofila  $\text{mg/L}$ ):** El promedio de la concentración de clorofila obtenido al inicio de los experimentos en presencia de arsénico realizados durante un periodo de 8 días para la microalga *C. vulgaris* fue  $30.82 \pm 7.32 \text{ mg/L}$  y la concentración final fue  $40.70 \pm 19.17 \text{ mg/L}$ ; mientras que para el periodo de 13 días se obtuvo una concentración inicial de  $29.24 \pm 5.70 \text{ mg/L}$  y final de  $70.65 \pm 11.50 \text{ mg/L}$ . En los tratamientos realizados con *S. dimorfus* se obtuvo un promedio de clorofila inicial de  $24.26 \pm 2.84 \text{ mg/L}$  y final de  $60.42 \pm 8.41 \text{ mg/L}$ . Mientras que los cultivos control de ambas microalgas (ausencia de arsénico en el medio), se observaron diferencias significativas con respecto al crecimiento en presencia de arsénico (Tabla 1). El pH de todos los experimentos se mantuvo constante a  $8.5 \pm 0.5$ .

Se observó un aumento de la biomasa el cual se evidencia con el incremento de la concentración de clorofila ( $\text{mg/L}$ ) durante los días del experimento. Basado en el modelo lineal, se observó un aumento del contenido de este pigmento a través de los días de crecimiento ( $P < 0.001$ ). Además, la microalga *C. vulgaris* posee

**Tabla 1**

Efecto del número de días de crecimiento y microalga en la concentración de clorofila (mg/l). / **Table 1.** Effect of growth days and microalgal species on chlorophyll concentration (mg/l).

Efecto	Coefficientes	SE	T	P
Intercepto	24.72	4.75	5.20	< 0.001
<i>Chlorella vulgaris</i>	6.74	3.96	1.72	0.092
Día de crecimiento	2.97	0.24	12.19	< 0.001
<i>Scenedesmus dimorfus</i> * día	-0.82	0.33	-2.46	< 0.001

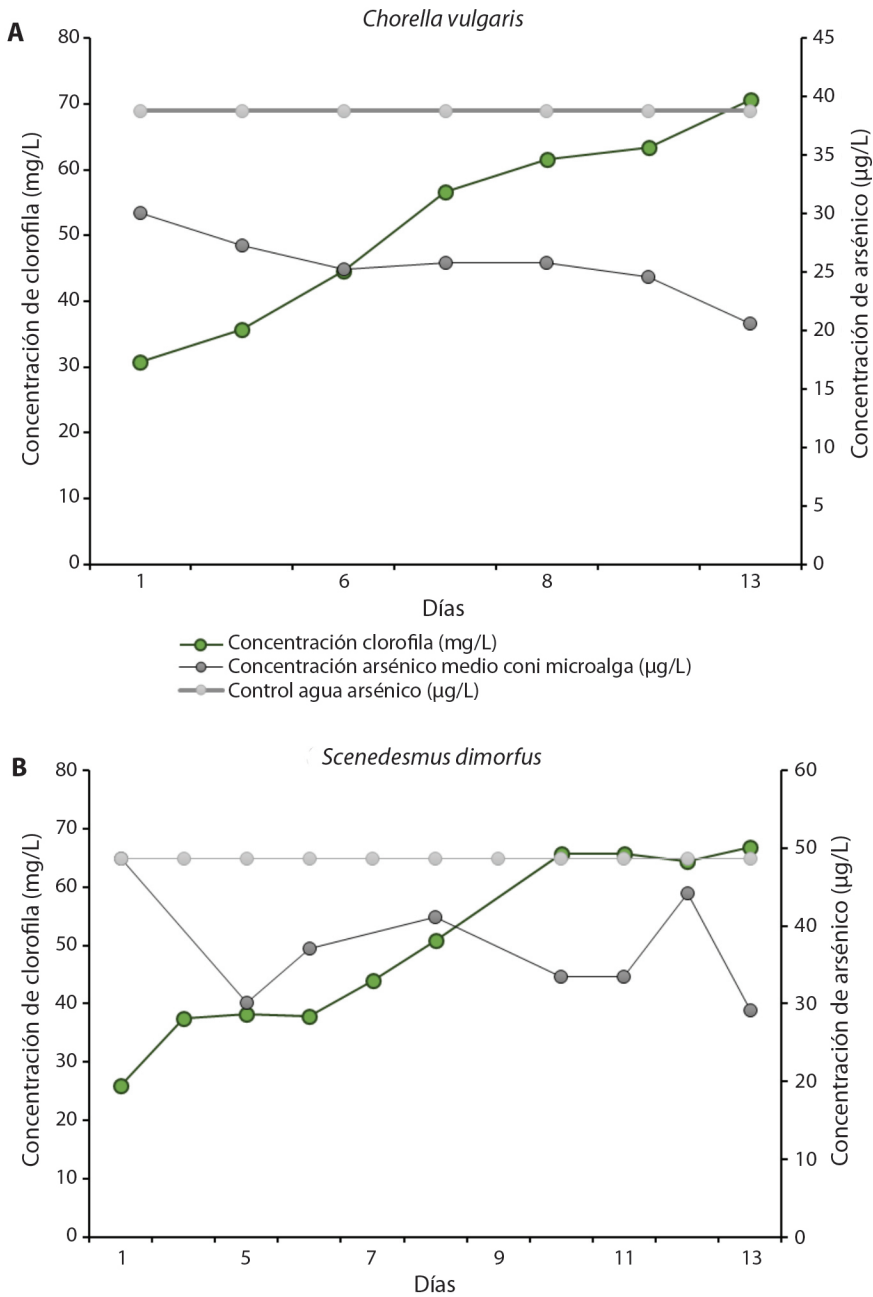


**Fig. 1.** Relación entre la concentración promedio de clorofila (mg/l) y el número de días de crecimiento del cultivo. El área sombreada corresponde a un intervalo de confianza de 95 % en el modelo de regresión lineal. / **Fig. 1.** Relationship between average chlorophyll concentration (mg/l) and biomass growth duration (days). The shaded region represents the 95 % confidence interval of the linear regression model.

un mayor contenido de clorofila diaria que *S. dimorfus* ( $P < 0.001$ ) (Fig. 1). Sin embargo, a partir del día 13 de experimento, el contenido de clorofila en las células de ambas especies no experimentó crecimiento. La Fig. 2A y Fig. 2B presentan la concentración de arsénico

promedio en el medio nutritivo y de clorofila total de *C. vulgaris* y *S. dimorfus* durante 13 días de experimento.

**Contenido de arsénico en el medio de cultivo (agua de Aguas Zarcas):** En los ensayos



**Fig. 2.** Distribución de la concentración de clorofila total (mg/L) y de arsénico (µg/L) en el medio nutritivo y control (agua con arsénico), **A.** *C. vulgaris* y **B.** *S. dimorfus*. / **Fig. 2.** Distribution of total chlorophyll concentration (mg/L) and arsenic concentration (µg/L) in the growth medium and control (water without microalgae), **A.** *C. vulgaris* y **B.** *S. dimorfus*.

realizados con *C. vulgaris* durante ocho días de crecimiento, se obtuvo una concentración promedio de arsénico al inicio del experimento de  $46.55 \pm 0.45$  ( $\mu\text{g/L}$ ) y final de  $37.00 \pm 0.45$  ( $\mu\text{g/L}$ ), mientras que el tratamiento control se mantuvo con un promedio de  $48.64 \pm 3.6$  ( $\mu\text{g/L}$ ) durante todos los días del experimento. Los experimentos realizados durante los 12–13 días mostraron una concentración promedio inicial de arsénico de  $30.09 \pm 9.99$  ( $\mu\text{g/L}$ ) y una concentración promedio final de  $20.56 \pm 7.15$  ( $\mu\text{g/L}$ ) (Tabla 2), el tratamiento control se mantuvo con un promedio de  $38.81 \pm 3.0$  ( $\mu\text{g/L}$ ). Adicionalmente, *S. dimorpus* obtuvo una concentración inicial de arsénico de  $41.02 \pm 8.12$  ( $\mu\text{g/L}$ ) y final de  $21.66 \pm 7.87$  ( $\mu\text{g/L}$ ) (Tabla 3).

En la evaluación de remoción de arsénico en cada uno de los tratamientos se observa en

el modelo lineal que ambas microalgas tuvieron un efecto positivo en la remoción de arsénico con respecto al tratamiento control ( $P < 0.001$ ) (Tabla 4). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de arsénico removidas entre *C. vulgaris* y *S. dimorpus* ( $P = 0.852$ , Fig. 3).

**Contenido de arsénico en la biomasa de las microalgas:** Al analizar la concentración de arsénico en la biomasa microalgal antes y después de los experimentos se obtuvo una concentración inicial de arsénico en *C. vulgaris* de  $0.12 \pm 0.100$   $\mu\text{g/g}$  y final de  $7.36 \pm 3.46$   $\mu\text{g/g}$ . En los tratamientos realizados con la microalga *S. dimorpus* la concentración inicial de la biomasa fue  $0.190 \pm 0.200$   $\mu\text{g/g}$  y la concentración final  $6.98 \pm 4.8$   $\mu\text{g/g}$ . Mediante la prueba t-student, se evidencia que las concentraciones promedio

**Tabla 2**

Concentración promedio de arsénico ( $\mu\text{g/L}$ ) presente al inicio y final del experimento, así como el porcentaje de remoción del medio nutritivo, en función de los días de crecimiento en el tratamiento con la microalga *Chlorella vulgaris*. / **Table 2.** Average arsenic concentration ( $\mu\text{g/L}$ ) at the beginning and end of the experiment, along with the removal percentage, as a function of growth duration in the treatment with the microalga *Chlorella vulgaris*.

Microalga	Días de crecimiento	Concentración inicial de arsénico ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentración final de arsénico ( $\mu\text{g/L}$ )	Porcentaje de remoción (%)
<i>C. vulgaris</i>	8 días	$46.55 \pm 0.45$	$37.00 \pm 0.45$	20.51
	13 días	$30.09 \pm 9.99$	$20.56 \pm 7.15$	31.67

**Tabla 3**

Concentración promedio de arsénico ( $\mu\text{g/L}$ ) presente al inicio y final del experimento, porcentaje de remoción con la microalga *Scenedesmus dimorpus*. / **Table 3.** Average arsenic concentration ( $\mu\text{g/L}$ ) at the beginning and end of the experiment, along with the removal percentage, as a function of growth duration in the treatment with the microalga *Scenedesmus dimorpus*.

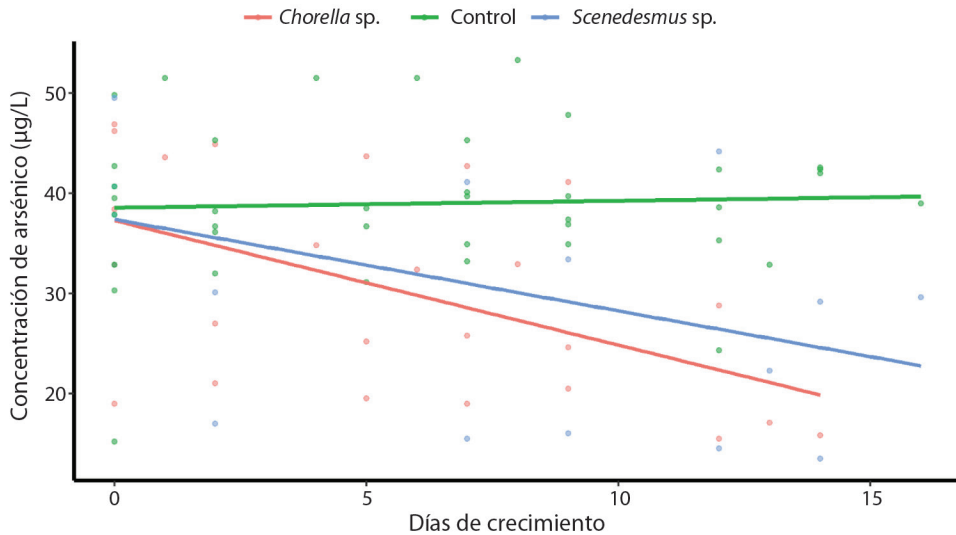
Microalga	Días de crecimiento	Concentración de arsénico inicial ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentración de arsénico final ( $\mu\text{g/L}$ )	Porcentaje de remoción
<i>S. dimorpus</i>	13 días	$41.02 \pm 8.12$	$21.66 \pm 7.87$	47.19%

**Tabla 4**

Comparación de las concentraciones de arsénico cuantificadas en el medio de cultivo para cada uno de los tratamientos correspondientes a *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus dimorpus* y control. / **Table 4.** Comparison of arsenic concentrations quantified in the culture medium for each treatment: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus dimorpus*, and control.

Efecto	Coefficientes	SE	T	P
Intercepto	30.42	3.02	10.06	< 0.001
Control	8.97	1.97	4.53	< 0.001
<i>S. dimorpus</i>	1.27	2.95	0.43	0.852





**Fig. 3.** Relación entre la concentración de arsénico  $\mu\text{g/L}$  presente en el medio nutritivo y el día de crecimiento de los cultivos de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* con respecto al tratamiento control. / **Fig. 3.** Relationship between arsenic concentration ( $\mu\text{g/L}$ ) in the medium and the growth days of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* strains, according to the control treatment.

**Tabla 5**

Concentración de arsénico ( $\mu\text{g/g}$ ) en la biomasa microalgal promedio al inicio y final del experimento y el porcentaje de bioacumulación en la biomasa de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus*. / **Table 5.** Average arsenic concentration ( $\mu\text{g/g}$ ) in microalgal biomass before and after the experiment, and the bioaccumulation percentage obtained with *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* treatments.

Microalga	Días de crecimiento	Concentración inicial de arsénico biomasa ( $\mu\text{g/g}$ )	Concentración final de arsénico biomasa ( $\mu\text{g/g}$ )	Porcentaje de bioacumulación (%)
<i>C. vulgaris</i>	13 días	$0.120 \pm 0.100$	$7.36 \pm 3.46$	98.36
<i>S. dimorphus</i>	13 días	$0.190 \pm 0.200$	$6.98 \pm 4.8$	97.27

de arsénico ( $\mu\text{g/g}$ ) presentes tanto en *C. vulgaris* ( $T = -4.18$ ,  $df = 4$ ,  $P = 0.0114$ ) como en *S. dimorphus* ( $T = -3.55$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.037$ ) fueron significativamente diferentes, observándose un aumento al final de cada experimento (Tabla 5).

## DISCUSIÓN

Es ampliamente reportado en la literatura la capacidad de las microalgas *C. vulgaris* y *S. dimorphus* de remover arsénico del medio de cultivo o en su efecto, la capacidad de bioacumular este metal a nivel celular (Leong & Chang, 2020), promoviendo estos microorganismos

como pioneros en la biorremediación de metales pesados y metaloides en fuentes de agua (Ahmed et al., 2022; Plöhn et al., 2021; Podder & Majumder, 2015; Saavedra et al., 2018; Wollmann et al., 2019). Ambas condiciones se han podido corroborar en el presente trabajo con dos microalgas nativas, las cuales fueron colectadas y aisladas en afluentes con altos niveles de arsénico como es el caso de la toma de agua de Vuelta Kooper, Agua Zarcas, Alajuela, Costa Rica (AyA, 2017). La propiedad de estas microalgas nativas del cuerpo de agua en estudio, les confiere ventajas con respecto a especies no nativas; debido a su capacidad de adaptación



que pueden presentar las especies nativas en aguas contaminadas con arsénico. Kalinowska & Pawlik-Skowronska (2010) señalan una mayor capacidad de acumulación de metales pesados por parte de cepas de microalgas aisladas de sitios contaminados comparados con especies aisladas de sitios no contaminados. El uso de algas nativas no sólo puede reducir la toxicidad del arsénico, sino también el efecto tóxico en el medio ambiente (Lima et al., 2020; Mao et al., 2022).

Los resultados obtenidos en esta investigación indican una disminución del crecimiento de la biomasa en términos de la concentración de clorofila y del arsénico en el medio nutritivo al final del treceavo día de cultivo; mientras que el cultivo de las microalgas creciendo en medio BG11 y en ausencia de arsénico (control) presentaron un crecimiento celular mayor de 13 días. La disminución del crecimiento de la biomasa al treceavo día de cultivo, parece indicar que la presencia del metal en el medio puede ser tóxico a las células, provocando la muerte o el deterioro de las organelas como ha sido confirmado por Mao et al., (2022). Este autor demostró una disminución de la clorofila en presencia de una alta concentración de arsénico, el cual se atribuye a una inhibición por parte del metal al ácido  $\delta$ -aminolevulínico y la enzima deshidrogenasa del ácido  $\delta$ -aminolevulínico implicados en la síntesis de clorofila *a* (Mao et al., 2022).

Aunque los medios de cultivo donde crecían las microalgas presentaron una remoción de arsénico, este metal no fue removido totalmente del medio de cultivo. Este comportamiento fue observado por Leong & Chang (2020). Entre las microalgas estudiadas, *S. dimorfus* presentó un porcentaje de remoción mayor del 50 % al final de la fase de crecimiento de la biomasa; mientras que *Chlorella vulgaris* removió menos de la mitad de la concentración de arsénico. Estas observaciones parecen indicar que es más eficiente la primera especie que la segunda; no obstante, el porcentaje de bioacumulación a nivel celular es similar entre ambas microalgas (98.36 % y 97.27 % respectivamente), evidenciándose en un incremento

del contenido de arsénico en la biomasa viva al final del experimento.

Los mecanismos usados por las microalgas para la remoción del arsénico del agua no fue estudiada en el presente trabajo; sin embargo, probablemente están relacionados con las siguientes capacidades de remoción reportados en la literatura: 1) incorporación dentro de las células (tolerancia) a través de la membrana celular, denominado incorporación activa, 2) acumulación/precipitación extracelular proceso que puede ser facilitado por microorganismos vivos y 3) bioadsorción o incorporación pasiva en la superficie celular facilitada por material extracelular como polisacáridos y mucílago (De Philippis et al., 2011) y componentes de la pared celular como sulfatos y fosfatos (Naja & Volesky, 2011). Estos mecanismos mencionados podrían explicar teóricamente el aumento de arsénico cuantificado en la biomasa final de las microalgas usadas, con respecto a la biomasa del inóculo inicial en el presente trabajo.

Aunque la concentración de arsénico presente en el medio nutritivo se mantiene superior a los niveles permitidos en el agua señalados por la Organización Mundial de la Salud (10  $\mu\text{g/L}$ ) (Montero-Campos et al., 2010), los resultados demostraron una disminución importante de este metal en el medio donde crecen las microalgas *C. vulgaris* y *S. dimorfus*; así como también una bioacumulación a nivel celular. Probablemente, un mecanismo para aumentar y optimizar la remoción de arsénico en el medio de cultivo consiste en incrementar la concentración celular inicial, condición importante para el posterior desarrollo del cultivo. Sin embargo, también es importante optimizar las variables ambientales como pH, temperatura y luz en el medio de cultivo que faciliten la remoción por medio de mecanismos de bioacumulación de adsorción o absorción celular. La importancia del pH ha sido estudiada por Tuzen et al., (2009), quienes demostraron un 98 % de bioadsorción por parte del alga *U. cylindricum* a pH 6.0; esta variable es fundamental en los mecanismos de adsorción en procesos de fitorremediación.



En este estudio se aislaron dos microalgas nativas de una fuente de agua caracterizada por poseer alto contenido de arsénico (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus*). Ambas microalgas han demostrado una buena capacidad para disminuir el contenido de arsénico en el medio nutritivo por medio de algún proceso de bioacumulación en sus componentes celulares. Los resultados; por consiguiente, aportan posibilidades de estudios de biomonitorio y biorremediación con microalgas nativas provenientes de aguas contaminadas con arsénico. De esta manera, provee un aporte para entender la problemática de contaminación de fuentes de agua potable en pro de la salud pública del país y de los ecosistemas acuáticos, como una solución económica y respetuosa con el medio ambiente, donde se espera que las microalgas representen organismos deseables para la biorremediación de ecosistemas contaminados con el metaloide arsénico.

**Declaración de ética:** los autores declaran que todos están de acuerdo con esta publicación y que han hecho aportes que justifican su autoría; que no hay conflicto de interés de ningún tipo; y que han cumplido con todos los requisitos y procedimientos éticos y legales pertinentes. Todas las fuentes de financiamiento se detallan plena y claramente en la sección de agradecimientos. El respectivo documento legal firmado se encuentra en los archivos de la revista.

## AGRADECIMIENTOS

Lic. Álvaro Cerdas-Cedeño por su apoyo técnico durante los experimentos realizados en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Cianobacterias (LABIOMIC) del CIMAR, al Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados (AyA) por la colaboración con la toma de las muestras en el sitio de estudio y a la Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica por el financiamiento del proyecto B9511. Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Microalgas y Cianobacterias (LABIOMIC) del CIMAR, Universidad de

Costa Rica y el Laboratorio Nacional de Aguas, Área de Microbiología, Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados (AyA).

## REFERENCIAS

- Alharbi, R. M., Sholkamy, E. N., Alsamhary, K. I., Abdel-Raouf, N., & Ibraheem, I. B. M. (2023). Optimization study of the capacity of *Chlorella vulgaris* as a potential bio-remediator for the bio-adsorption of arsenic (III) from aquatic environments. *Toxics*, 11(5), 439. <https://doi.org/10.3390/toxics11050439>
- Ahmed, S. E., Mofijur, M., Parisa, T. A., Islam, N., Kusumo, F., Inayat, A., Le, V. G., Badruddin, I. A., Khan, T. M. Y., & Ong, H. C. (2022). Progress and challenges of contaminate removal from wastewater using microalgae biomass. *Chemosphere*, 286(1), 131656. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131656>
- Agilent Technologies. (2011). *Manual del usuario ICP-MS serie 7700x* [Manual de equipo]. Agilent Technologies. <https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5990-4025ES.pdf>
- American Public Health Association, American Water Works Association, & Water Environment Federation. (2023). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (23rd ed.). American Public Health Association.
- Arica, M. Y., Tüzün, İ., Yalçın, E., İnce, Ö., & Bayramoğlu, G. (2005). Utilization of native, heat and acid-treated microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* preparations for biosorption of Cr (VI) ions. *Process Biochemistry*, 40(7), 2351–2358. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.09.008>
- Arias-Barrantes, B. (2020). *Determinación de As (III) y As (V) en aguas de consumo humano mediante las técnicas de cromatografía de intercambio aniónico y espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo* [Tesis de Licenciatura]. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Arora, N., Gulati, K., Patel, A., Pruthi, P. A., Poluri, K. M., & Pruthi, V. (2017). A hybrid approach integrating arsenic detoxification with biodiesel production using oleaginous microalgae. *Algal Research*, 24, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.012>
- Awasthi, S., Chauhan, R., Dwivedi, S., Srivastava, S., Srivastava, S., & Tripathi, R. D. (2018). A consortium of alga (*Chlorella vulgaris*) and bacterium (*Pseudomonas putida*) for amelioration of arsenic toxicity in rice: A promising and feasible approach. *Environmental and Experimental Botany*, 150, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.03.001>
- Bozeman, J., Koopman, B., & Bitton, G. (1989). Toxicity testing using immobilized algae.



- Aquatic Toxicology*, 14(4), 345–352. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(89\)90032-5](https://doi.org/10.1016/0166-445X(89)90032-5)
- De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101(6), 1611–1627. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.043>
- De Philippis, R., Colica, G., & Micheletti, E. (2011). Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 697–708. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3601-z>
- García, N. J. M., & Azofeifa, I. V. (2020). Arsénico en suelos y rocas de origen volcánico en un área de Aguas Zarcas y La Palmera, zona norte de Costa Rica. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 36(1), 23–36.
- Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados. (2016). *Informe de parámetros que incumplen con el reglamento para la calidad del agua potable operados por asociación administradoras de acueductos y alcantarillados (ASADAs) 2012-2015* [Informe técnico]. Laboratorio Nacional de Aguas, Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados, Costa Rica.
- Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados (2017). *Informe sobre la Eficiencia de las Plantas de Remoción de Arsénico en Cañas, Bagaces y Los Chiles Período 2014-2016* [Informe técnico]. Laboratorio Nacional de Aguas, Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados, Costa Rica.
- Jiang, Y., Purchase, D., Jones, H., & Garelick, H. (2011). Effects of arsenate (As<sup>5+</sup>) on growth and production of glutathione (GSH) and phytochelatin (PCS) in *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Phytoremediation*, 13(8), 834–844. <https://doi.org/10.1080/15226514.2010.525560>
- Kalinowska, R., & Pawlik-Skowrońska, B. (2010). Response of two terrestrial green microalgae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) isolated from Cu-rich and unpolluted soils to copper stress. *Environmental Pollution*, 158(8), 2778–2785. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.03.003>
- Kalra, Y. (1998). *Handbook of reference methods for plant analysis*. Soil and Plant Analysis Council.
- Kaplan, G. (2013). Absorption and adsorption of heavy metals by microalgae. In A. Richmond & Q. Hu (Eds.), *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology* (2nd Ed., pp. 602–611), John Wiley and Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch32>
- Kumar, K. S., Dahms, H. U., Won, E. J., Lee, J. S., & Shin, K. H. (2015). Microalgae—a promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 329–352. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.019>
- Kumar, R., Patel, M., Singh, P., Bundschuh, J., Pittman Jr, C. U., Trakal, L., & Mohan, D. (2019). Emerging technologies for arsenic removal from drinking water in rural and peri-urban areas: Methods, experience from, and options for Latin America. *Science of the Total Environment*, 694, 133427. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.233>
- Leong, Y. K., & Chang, J. S. (2020). Bioremediation of heavy metals using microalgae: Recent advances and mechanisms. *Bioresource Technology*, 303, 122886. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122886>
- Lima, S., Villanova, V., Grisafi, F., Caputo, G., Brucato, A., & Scargiali, F. (2020). Autochthonous microalgae grown in municipal wastewaters as a tool for effectively removing nitrogen and phosphorous. *Journal of Water Process Engineering*, 38, 101647. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101647>
- Llorente-Mirandes, T., Ruiz-Chancho, M. J., Barbero, M., Rubio, R., & López-Sánchez, J. F. (2010). Measurement of arsenic compounds in littoral zone algae from the Western Mediterranean Sea. Occurrence of arsenobetaine. *Chemosphere*, 81(7), 867–875. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.007>
- Lomax, C., Liu, W. J., Wu, L., Xue, K., Xiong, J., Zhou, J., McGrath, S. P., Meharg, A. A., & Zhao, F. J. (2012). Methylated arsenic species in plants originate from soil microorganisms. *New Phytologist*, 193(3), 665–672. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03956.x>
- Mao, Q., Xie, Z., Irshad, S., Zhong, Z., Liu, T., Pei, F., Gao, B., & Li, L. (2022). Effect of arsenic accumulation on growth and antioxidant defense system of *Chlorella thermophila* SM01 and *Leptolyngbya* sp. XZMQ. *Algal Research*, 66, 102762. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102762>
- Monteiro, C. M., Castro, P. M., & Malcata, F. X. (2012). Metal uptake by microalgae: underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology Progress*, 28(2), 299–311. <https://doi.org/10.1002/btpr.1504>
- Montero-Campos, V., Quesada-Kimsey, J., Ledezma-Espinoza, A., & Sandoval-Mora, J. A. (2010). Determinación de arsénico en abastecimientos de agua para consumo humano de la provincia de Cartago, Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 52(2), 96–101.
- Naja, G., & Volesky, B. (2011). The mechanism of metal cation and anion biosorption. In P. Kotrba, M. Mackova, & T. Macek (Eds.), *Microbial biosorption of metals* (pp. 19–58). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0443-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0443-5_3)
- Pacheco, M. M., Hoeltz, M., Moraes, M. S., & Schneider, R. C. (2015). Microalgae: cultivation techniques and wastewater phycoremediation. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 50(6), 585–601. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.994951>



- Perales-Vela, H. V., Peña-Castro, J. M., & Canizares-Villanueva, R. O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.024>
- Podder, M. S., & Majumder, C. B. (2015). Phycoremediation of arsenic from wastewaters by *Chlorella pyrenoidosa*. *Groundwater for Sustainable Development*, 1(1–2), 78–91. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2015.12.003>
- Plöhn, M., Spain, O., Sirin, S., Silva, M., Escudero-Oñate, C., Ferrando-Climent, L., Allahverdiyeva, Y., & Funk, C. (2021). Wastewater treatment by microalgae. *Physiologia Plantarum*, 173(2), 568–578. <https://doi.org/10.1111/ppl.13427>
- Qiao, K., Ran, Y., Zhang, L., Liu, X., Sun, Z., Chai, T., Gong, S., & Hu, Z. (2024). *Scenedesmus acuminatus* as a potential phycoremediator: Enrichment and detoxification of cadmium/lead. *Algal Research*, 82, 103677. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103677>
- Radix, P., Léonard, M., Papanioniou, C., Roman, G., Saouter, E., Gallotti-Schmitt, S., Thiébaud, H., & Vasseur, P. (2000). Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria, and invertebrates assessed with sixteen chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47(2), 186–194. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1966>
- Rubio, R., Ruiz-Chancho, M. J., & López-Sánchez, J. F. (2010). Sample pre-treatment and extraction methods that are crucial to arsenic speciation in algae and aquatic plants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(1), 53–69. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.10.002>
- R Core Team. (2024). *R: A language and environment for statistical computing* [Computer software]. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., & Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology*, 111(1), 1–61. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>
- Saavedra, R., Muñoz, R., Taboada, M. E., Vega, M., & Bolado, S. (2018). Comparative uptake study of arsenic, boron, copper, manganese and zinc from water by different green microalgae. *Bioresource Technology*, 263, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.101>
- Suresh, B., & Ravishankar, G. A. (2004). Phytoremediation— a novel and promising approach for environmental clean-up. *Critical Reviews in Biotechnology*, 24(2–3), 97–124. <https://doi.org/10.1080/07388550490493627>
- Touloupakis, E., Faraloni, C., Silva Benavides, A. M., & Torzillo, G. (2021). Recent achievements in microalgal photobiological hydrogen production. *Energies*, 14(21), 7170. <https://doi.org/10.3390/en14217170>
- Tuzen, M., Sari, A., Mendil, D., Uluozlu, O. D., Soylak, M., & Dogan, M. (2009). Characterization of biosorption process of As (III) on green algae *Ulothrix cylindricum*. *Journal of Hazardous Materials*, 165(1–3), 566–572. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.10.020>
- Vohra, D. F. (1966). Determination of photosynthetic pigments in sea-water. *Monographs Onocéanographie Methodology*, 1(13), 1–69.
- Wollmann, F., Dietze, S., Ackermann, J. U., Bley, T., Walther, T., Steingroewer, J., & Krujatz, F. (2019). Microalgae wastewater treatment: biological and technological approaches. *Engineering in Life Sciences*, 19(12), 860–871. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900071>
- Xu, P., Tu, X., An, Z., Mi, W., Wan, D., Bi, Y., & Song, G. (2024). Cadmium-induced physiological responses, biosorption and bioaccumulation in *Scenedesmus obliquus*. *Toxics*, 12(4), 262. <https://doi.org/10.3390/toxics12040262>