



Encuentro  
de JÓVENES  
INVESTIGADORES

## ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DE LAS AGUAS RESIDUALES URBANAS SOBRE MICROALGAS PLANCTÓNICAS

**Emily, Basso**

*Laboratorio de Ecotoxicología. Departamento de Ciencias Naturales. FHUC-UNL*

*Directora: Wanda, Polla*

*Co-directora: Natalí, Romero*

Área: Ciencias naturales

Palabras clave: Efluentes domésticos, Clorófitas, Estado fisiológico

### INTRODUCCION

Las aguas residuales urbanas (ARUs) son efluentes de composición diversa que proceden de zonas de vivienda y de servicios generadas principalmente por el metabolismo humano y las actividades domésticas (Directiva 91/271/CEE, 1991). La ciudad de San Justo (Santa Fe) cuenta con una planta de tratamiento donde las ARUs son tratadas en lagunas de estabilización que permiten obtener la calidad establecida en la legislación vigente para su vuelco al río Salado. Sin embargo, surge la necesidad de ampliar el conocimiento respecto a su ecotoxicidad con el fin de minimizar riesgos ambientales y de la salud de la población. Las microalgas planctónicas son la base de las redes tróficas, presentan una rápida tasa de división celular, facilidad de cultivo y sensibilidad a diferentes sustancias, por lo que se utilizan habitualmente en ensayos de toxicidad (Castillo-Morales 2004; Stone et al, 2019).

### OBJETIVO

- Evaluar la posible toxicidad de ARUs generadas y tratadas en la ciudad de San Justo (Santa Fe) en período invernal y estival mediante el análisis del crecimiento celular, diámetro, biovolumen, biomasa y composición de pigmentos fotosintéticos de microalgas expuestas a estos efluentes.

### METODOLOGÍA

El efluente fue recolectado en la planta de tratamiento (PT) de ARUs de la ciudad de San Justo (Santa Fe). La misma trabaja con efluentes cloacales domiciliarios exclusivamente y se encuentra al oeste de la ciudad (30°78'93"S y 60°62'09"O). El efluente fue recolectado en julio de 2022 (invierno) y febrero de 2023 (verano) en el punto de intersección de ambas Lagunas Facultativas Secundarias (LFS). Empleando el equipo multiparamétrico (YSI Professional Plus) se midió *in situ*: temperatura (°C), pH, conductividad ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) y oxígeno disuelto (OD  $\text{mg L}^{-1}$ ). Se determinó DQO ( $\text{mg L}^{-1}$ ), DBO ( $\text{mg L}^{-1}$ ), nitrógeno total ( $\text{mg L}^{-1}$ ); nitrato ( $\text{mg L}^{-1}$ )

Título del proyecto: Tratamiento de efluentes urbanos: remediación y bioprospección de microalgas de interés biotecnológico.

Instrumento: PICT

Año de convocatoria: 2019

Organismo financiador: Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT)

Directora: Luciana, Regaldo



NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); nitrito (mg L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), amonio (mg L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub><sup>+</sup>); sulfuros (mg L<sup>-1</sup>); y fósforo total (mg L<sup>-1</sup>). Las determinaciones se realizaron siguiendo metodologías estandarizadas (APHA, 2017).

Se generaron cultivos stock de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Tetrademus obliquus* bajo condiciones controladas (23 ± 2 °C, 8000 lux y aireación) en medio nutritivo Detmer y J/I, respectivamente (Borowitzka, 1988; Suhendrayatna et al., 1999). Fueron cosechadas en fase de crecimiento exponencial, centrifugadas y resuspendidas en agua ultrapura estéril. La concentración (cél. mL<sup>-1</sup>) fue estimada por conteo celular directo con cámara de Neubauer.

Se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento algal siguiendo protocolos estandarizados (OECD, 2011). Para ambas especies se emplearon 6 diluciones de ARUs con medio nutritivo (D1:5%, D2:10%, D3:20%, D4:40%, D5:80% y D6: 100%) y un control negativo (100% medio nutritivo) por triplicado, con una concentración inicial de 10000 células mL<sup>-1</sup> durante 72 o 96 h y temperatura e iluminación constantes (23 ± 2 °C, 8000 lux). *Chlorella vulgaris* fue expuesta a las ARUs de ambos períodos, mientras que *Tetrademus obliquus* fue expuesta a las ARUs del período estival. El porcentaje de inhibición (I%) y la tasa de crecimiento (μ) fueron calculados de acuerdo a OECD (2011). Se calculó el biovolumen a partir de la estimación del volumen celular aproximando la forma de la célula a una forma geométrica (Hillebrand et al., 1999). Se determinó la biomasa seca (mg L<sup>-1</sup>) por diferencias entre peso húmedo y seco. Se determinó el contenido de clorofila-a, b, total, feofitina y carotenos (APHA, 2012) y se calcularon las concentraciones mediante las ecuaciones de Lorenzen (1967), Jeffrey (1968) y Jeffrey y Humphrey (1975). Para los puntos finales evaluados los datos fueron analizados mediante ANOVA y test de Dunnett o test de Kruskal-Wallis y post test de Dunn tras evaluar la normalidad y la homocedasticidad (SigmaPlot 12.0).

## RESULTADOS

Se realizó la caracterización físico-química y bacteriológica de las ARUs empleadas en los ensayos de toxicidad: demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO), sulfuros, nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y fosforo (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), sólidos suspendidos totales, coliformes totales y coliformes fecales termotolerantes (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros físico-químicos y bacteriológicos del efluente crudo (EC), lagunas facultativas secundarias (LFS) y del efluente de salida post-cloración (F).

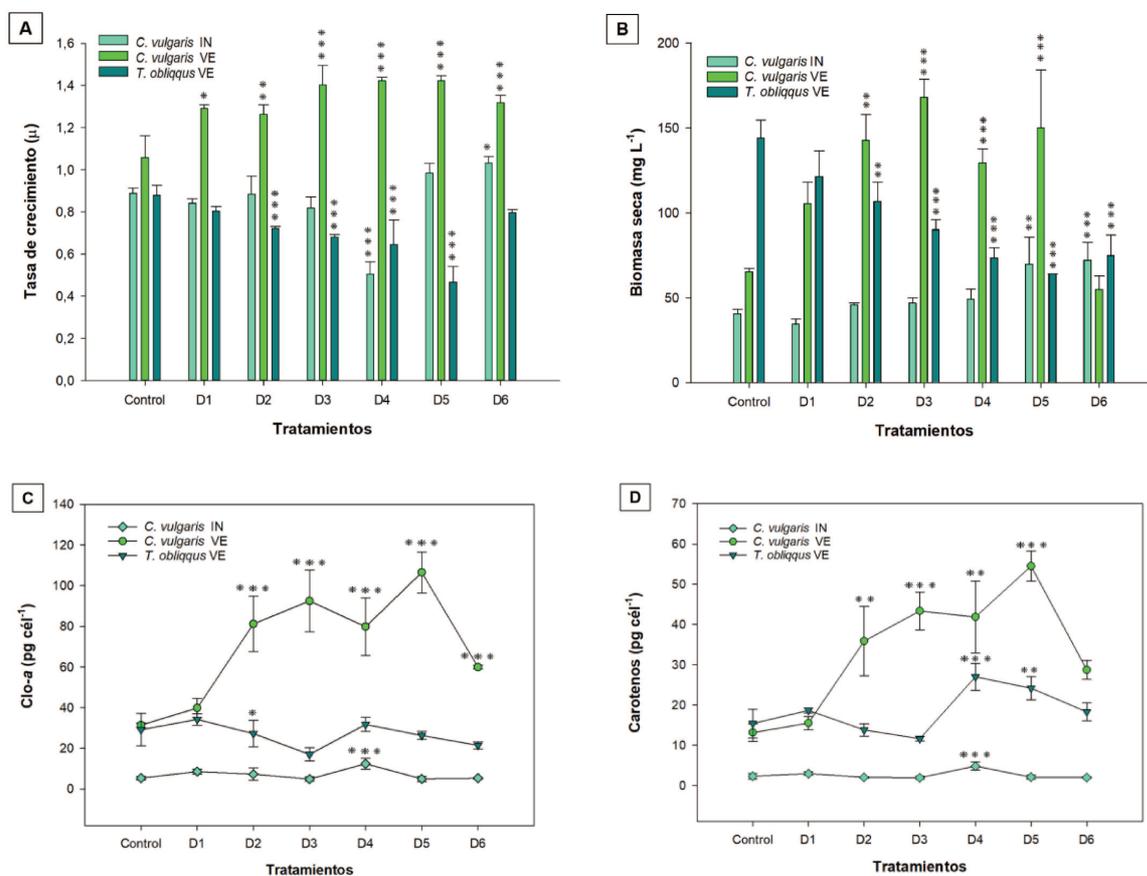
Parámetro	1/8/2022			28/2/2023		
	EC	LFS	F	EC	LFS	F
pH	8.24	8.16		7.84	8.47	
DQO	484.9	201	216.6	459	150.6	181.3
DBO	221.5	36.8	54.5	199.7	18.7	41.4
Sulfuros	1	0.2	0.2	1.5	0.2	0.2
Sólidos suspendidos totales	103	55	71	15	31	70
Nitratos	0.53	8.41		0	601.22	
Nitritos	0.13	1.22		0	1.28	
Amonio	29.9	9.3		65.5	18.72	
Fósforo	11.95	6.74		6.04	4.20	
Coliformes totales	21000000	240000	900	110000000	99000	46000
Coliformes fecales Termotolerantes	9300000	9300	400	110000000	44000	4800

Las ARUs recolectadas en el período invernal inhibieron el crecimiento de *C. vulgaris* en las diluciones D1 a D4 en relación al control (I%: 5 a 43), mientras que, en D5 y D6 el crecimiento se vio estimulado hasta 1,2 veces respecto al control. La μ disminuyó hasta 0,6 veces respecto al control en D4 y resultó ser 1,2 veces superior a éste en D6 (p<0,001; p=0,017, respectivamente) (Fig. 1A). El diámetro aumentó en todas las diluciones presentado diferencias significativas en D2 y D4 superando hasta 1,2 veces al control (p<0,001 y p=0,014, respectivamente). El biovolumen presentó un máximo en D6 (1,6 veces superior al control) y un mínimo en D4, siendo la mitad del biovolumen registrado para el control (p=0,006). La biomasa aumentó de D2 a D6, superando al control 1,78 veces en D6, con diferencias

significativas en D5 y D6 ( $p=0,002$  y  $p=0,001$ , respectivamente) (Fig. 1B). En todas las diluciones se registraron cambios en la concentración de pigmentos con un aumento máximo en D4, donde el contenido de clorofila-*a*, clorofila total, carotenos y feofitina duplicó la concentración determinada en el control ( $p<0,01$ ) (Fig. 1C y D).

Las ARUs recolectadas en verano estimularon la  $\mu$  de *C. vulgaris* en todas las diluciones respecto al control ( $p\leq 0,003$ ), con un máximo en D5 superándolo 1,3 veces (Fig. 1A). Además, este parámetro presentó un incremento superior en el periodo estival respecto al invernal para esta especie. No hubo cambios en el diámetro celular, pero si se registró un aumento significativo del biovolumen en D3 de 2,7 veces en relación al control ( $p<0,001$ ). La biomasa aumentó de D1 a D5, superando al control hasta 2,6 veces ( $p\leq 0,002$ ) (Fig. 1B). La concentración de pigmentos se incrementó en todas las diluciones respecto al control, resultando superior en D5. El contenido de clorofila-*a* y clorofila total aumentó de D2 a D6 hasta 3,4 veces respecto al control ( $p<0,001$ ) (Fig. 1C). Mientras que, el contenido de clorofila-*b*, carotenos y feofitina incrementó de D2 a D5 ( $p<0,001$ ) superando al control hasta 4,2 veces (Fig. 1D).

Las ARUs recolectadas en verano inhibieron el crecimiento de *T. obliquus* en todas las diluciones respecto al control (I%: 9 a 47), con diferencias significativas de D2-D5 ( $p<0,001$ ) (Fig. 1A). El diámetro celular no se vio afectado, pero el biovolumen disminuyó en todas las diluciones, con diferencias significativas de D2 a D5 de hasta 0,4 veces respecto al control ( $p\leq 0,013$ ). La biomasa se redujo en todas las diluciones hasta 0,8 veces en relación con el control, con diferencias significativas en D2 a D6 ( $p\leq 0,002$ ) (Fig. 1B). La concentración de clorofila-*a* y clorofila total disminuyó en D2, D3, D5 y D6 respecto al control, con diferencias significativas en D3 ( $p<0,03$ ) (Fig. 1C). El contenido de carotenos aumentó en D1 y D4 a D6 con relación al control, resultando significativo en D4 y D5 ( $p=0,003$  y  $p<0,001$ , respectivamente) (Fig. 1D). El contenido de feofitina, por su parte, se vio incrementado en todas las diluciones ( $p\leq 0,011$ ).



**Figura 1. A-** Tasa de crecimiento de *C. vulgaris* y *T. obliquus* expuesta a diferentes diluciones (D1: 5%, D2: 10%, D3: 20%; D4: 40%, D5: 80%, D6: 100%) de ARUs (IN, VE) a las 72 y 96 h. **B-** Biomasa seca ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de *C. vulgaris* y *T. obliquus* expuesta a diferentes diluciones de ARUs (IN, VE) luego de 72 y 96 h de exposición. **C-** Contenido de clorofila-*a* (Clo-*a*;  $\text{pg cél}^{-1}$ ) de *C. vulgaris* y *T. obliquus* a diferentes diluciones de ARUs (IN, VE) luego de 72 y 96 h de exposición. **D-** Contenido de carotenos ( $\text{pg cél}^{-1}$ ) de *C. vulgaris* y *T. obliquus* a diferentes diluciones de ARUs (IN, VE) luego de 72 y 96 h de exposición. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  DE. Las diferencias significativas como \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## CONCLUSIONES

Los atributos morfo-fisiológicos estudiados en *Chlorella vulgaris* expuesta a las ARUs del período estival resultaron estimulados en la mayoría de las diluciones, incluso en la exposición al efluente puro, evidenciándose una posible aplicación de las ARUs como medio nutritivo para su cultivo. En *Tetrademus obliquus* por su parte, todos los atributos se hallaron reducidos respecto al control, exceptuando pigmentos fotosintéticos y diámetro celular. Estos estudios aportan al conocimiento de potenciales aplicaciones de las ARUs en la economía circular y plantean la necesidad de profundizar estas temáticas a la vez que aporta a la toma de decisiones relacionadas con la gestión de la planta de tratamiento de efluentes a nivel local, tendiente a la protección de la salud humana y de los servicios ambientales regionales.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- APHA.** (2012). American Public Health Association. Standard Methods for examination of water and wastewater. 10-22. ISBN 978-087553-013-0
- APHA** (2017). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23th Edition. Washington. ISBN 978-0-87553-287-5
- Borowitzka, M.A & Borowitzka, L.J.** (1988). Microalgal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Brown, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M., & West, G. B.** (2004). Toward a metabolic theory of ecology. Ecology, 85(7), 1771–1789.
- Bryan, A. K., Engler, A., Gulati, A. & Manalis, S.R.** (2012). Continuous and long-term volume measurements with a commercial coulter counter. PLoS ONE, 7(1), 1–8.
- Castillo Morales, G.** (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo e Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, IDRC-IMTA. 135p.
- Directiva 91/271/CEE.** (1991). Tratamiento de las aguas residuales urbanas. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-1991-80646>.
- Hillebrand, H., Dürselen, C.D., Kirschtel, D., Pollinger, U. & T. Zohary.** (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. J. Phycol. 35, 403–424.
- Jeffrey, S.W.** (1968). Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae. Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 162, 271–285.
- Jeffrey, S.W. & Humphrey, G.F.** (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. und Physiol. der Pflanz. 167, 191–194.
- Lorenzen, C.J.** (1967). Determination of chlorophyll and pheo-pigments: spectrophotometric equations 1. Limnol. Oceanogr. 12, 343–346.
- OECD.** (2011). Organization for Economic Cooperation and Development. Growth inhibition test (201). Paris.
- Stone, S., Adams, M., Stauber, J., Jolley, D., Warne, M.** (2019). Development and application of a multispecies toxicity test with tropical freshwater microalgae. Environmental pollution, 250, 97-106.
- Suhendrayatna, O.A., Kuroiwa, T., Maeda, S.** (1999). Arsenic compounds in the freshwater green microalga *Chlorella vulgaris* after exposure to arsenite. Applied Organometallic Chemistry, 13(2), 127-133.