

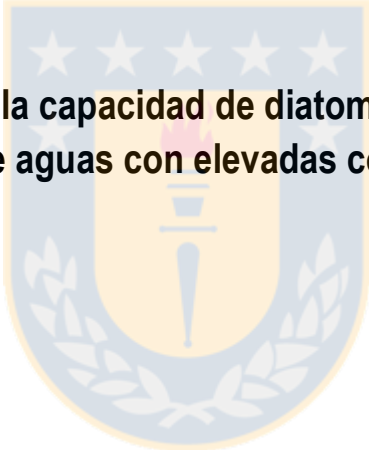


Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Ambientales

Programa de Doctorado en Ciencias Ambientales Mención Sistemas Acuáticos Continentales



**Evaluación de la capacidad de diatomeas bentónicas como
biorremediadores de aguas con elevadas concentraciones de arsénico**

Tesis para optar al grado de

Doctor en Ciencias Ambientales con mención en Sistemas Acuáticos Continentales

EIMMY ELIZABETH RAMÍREZ MARÍN

CONCEPCIÓN-CHILE
2015



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Ambientales
Programa de Doctorado en Ciencias Ambientales Mención Sistemas Acuáticos Continentales

**Evaluación de la capacidad de diatomeas bentónicas como
biorremediadores de aguas con elevadas concentraciones de arsénico**

Tesis para optar al grado de

Doctor en Ciencias Ambientales con mención en Sistemas Acuáticos Continentales

EIMMY ELIZABETH RAMÍREZ MARÍN

Profesor Guía: Dr. Roberto Urrutia Pérez

Dpto. de Sistemas Acuáticos, Facultad de Ciencias Ambientales

Universidad de Concepción

CONCEPCIÓN-CHILE

2015

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Cultivo de Microalgas FICOLAB, Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. Y Laboratorio de Especiación de Elementos Traza TESLA, Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Ingeniería y Ciencias Físicas, Universidad de Aberdeen, Aberdeen, Escocia, U.K.



Profesores Integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Roberto Urrutia Pérez

Dr. Oscar Parra Barrientos

Dra. Fabiola Cruces López

Dr. Jorge Yáñez Solorza



FINANCIAMIENTO:

Fondecyt N° 1120807

Proyecto “CRHIAM/CONICYT/FONDAP/15130015”

Beca de Apoyo a la realización de Tesis Doctoral en Chile, Comisión Nacional de Investigación, Ciencia y Tecnología (CONICYT), Ministerio de Educación, Chile.

Beca de pasantía Doctoral en el extranjero, Becas Chile, Comisión Nacional de Investigación, Ciencia y Tecnología (CONICYT), Ministerio de Educación, Chile.

Beca para estudios de Doctorado en Chile, Comisión Nacional de Investigación, Ciencia y Tecnología (CONICYT), Ministerio de Educación, Chile.

Beca de Extensión, Dirección de Postgrado, Universidad de Concepción, Chile.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero mencionar a mi profesor guía, Roberto Urrutia, por contribuir en mi formación científica, constante apoyo, disposición y confianza. Pero sobre todo agradezco su simplicidad y calidad humana.

Igualmente importantes fueron las profesoras, Mariela Gonzáles, Ana Silvia Cifuentes, Ingrid Inostrosa y Maria Davila de FICOLAB, donde desarrollé gran parte de mis experimentos. Esto nos permitió conocernos en profundidad y formar lindas amistades.

A mis compañeros y amigos del doctorado; Paulina Aguayo, Guisella Escalante, Claudio Salazar, Francisco Correa y Felipe Tuca, quienes han sido una especie de familia durante todo este tiempo.

A mis amigas y amigos Yovanka, Renata, Maria Cristina, Karen, Macarena, Moises, Alejandro, Enrique y Luis, que me han acompañado a la distancia, entregandome su apoyo incondicional en todo momento, por escucharme y conocerme tanto. Tambien a esas personas inesperadas que han sido como un regalo y me entregaron su cariño y comprensión en los momentos difíciles en especial a Maria Eliza.

No puedo dejar de mencionar a las secretarias, Lorena Valencia, Andrea Zambrano, y auxiliares del Centro EULA por su cariño y favores concedidos.

Finalmente, sólo puedo agradecer profundamente a mí familia querida, por ser mi motor, en especial a mí madre y padre por todo su amor y esfuerzo para que mis hermanos y yo tuviéramos la mejor educación y tantas otras cosas más. También quiero destacar a mis tías Delfina y Kiki por estar siempre presentes y a mí tío Uber por su apoyo constante.

A mis...Padres.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN GENERAL	11
HIPÓTESIS DE TRABAJO	16
OBJETIVOS	16
CAPÍTULO I: Toxicidad del arsenato para cuatro cepas de diatomeas bentónicas aisladas del Salar del Huasco (Norte de Chile, 20° S) bajo condiciones de laboratorio	17
Resumen	17
Introduction	17
Material and methods	19
<i>Lugar de Muestreo</i>	19
<i>Preparación de las muestras para la cuantificación de As</i>	19
<i>Instrumentación</i>	20
<i>Colecta, aislamiento y establecimiento de cultivo unialgal</i>	20
<i>Identificación de las Diatomeas</i>	21
<i>Condiciones experimentales de los bioensayo de inhibición de crecimiento</i>	21
<i>Análisis estadísticos</i>	21
Resultados	21
<i>Cuantificación de arsénico total en las matrices ambientales abióticas y bióticas</i>	21
<i>Bioensayos de inhibición de crecimiento</i>	22
Discusión	23
Acknowledgements	24
References	24
CAPÍTULO II: Culture and growth of two benthic diatoms species isolated from the Salar del Huasco (North of Chile, 20° S) at different conditions of temperature, light and nutrient	28
Abstract	28
Introduction	30
Material and methods	31
<i>Sample site</i>	31
<i>Physicochemical analyses</i>	32
<i>Collection, isolation and establishment of unialgal culture</i>	32
<i>Diatom identification</i>	32
<i>Experimental culture conditions</i>	33
<i>Statistical analyses</i>	33
Results	34
<i>Physicochemical analysis</i>	34
<i>Diatoms identification</i>	34
<i>Growth curves at different temperatures</i>	36
<i>Growth curves at different light intensities</i>	37

<i>Effects of the changes in the concentration of silica and selenium</i>	37
Discussion	38
Acknowledgements	41
References	41
CAPÍTULO III: Bioconcentration and biotransformation of arsenate by benthic diatom <i>Nitzchia epithemioides</i> grunow in cleve & grunow (1880) under different phosphate concentrations	48
Abstract	48
Introduction	48
Material and methods	50
<i>Collection, isolation and maintenance of stock cultures</i>	50
<i>Arsenate experiments</i>	51
<i>Instrumentation</i>	51
<i>Sample preparation for speciation analysis</i>	51
<i>Arsenic speciation using HPLC-ICP-MS/ES-MS</i>	52
<i>Statistical analyses</i>	52
Results	53
<i>Growth of <i>N. epithemioides</i> in batch cultures</i>	53
<i>Arsenic uptake by microalgae</i>	54
<i>Arsenic species</i>	55
Discussion	59
<i>Growth of <i>N. epithemioides</i> in batch cultures</i>	59
<i>Arsenic uptake by microalgae</i>	59
<i>Arsenic species</i>	59
Acknowledgments	61
References	61
DISCUSIÓN GENERAL	67
CONCLUSIONES	70
REFERENCIAS	71

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I.

Tabla I. Condiciones de parámetros instrumentales para cuantificación de arsénico mediante HG-AAS.....	20
Tabla II. Concentraciones de arsénico total en matrices abióticas y bióticas de laguna Huasco, Salar del Huasco.....	22

CAPÍTULO II.

Table I. Different concentrations of silicate and selenium in basic f/2 medium.....	33
Table II. Physical and chemical parameters of water from Lagoon Huasco.....	34

CAPÍTULO III.

Table I. Total arsenic (per gram of dried algal cells) extracted from algal cells determined by HPLC-ICP-MS.....	55
Table II. Arsenic (per gram of dried algal cells) measured in water/peroxide (1: 1) extraction for speciation and methanol/dichloromethanol (1: 2) extraction for residues of <i>N. epithemioides</i>	55
Table III. Concentrations of arsenic species (dry weight) in the Water-soluble <i>Nitzschia epithemioies</i> extracts on day 4 of culture, for different phosphate conditions, all other nutrients at f/2 concentrations, determined by anion exchange chromatography on a PRP-X100 column.....	57
Table IV. Concentrations of arsenic species (dry weight) in the Water-soluble <i>Nitzschia epithemioies</i> extracts on day 8 of culture, for different phosphate conditions, all other nutrients at f/2 concentrations, determined by anion exchange chromatography on a PRP-X100 column.....	57
Table V. Concentrations of lipids arsenic species (dry weight) in the methanol/DCM <i>Nitzschia epithemioies</i> extracts on day 8 of culture, for different phosphate conditions, all other nutrients at f/2 concentrations, determined by cation exchange chromatography on a XDB C18 column.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Mapa de sitio de muestreo en sector norte de laguna Huasco, Salar de Huasco, norte de Chile.....	21
Figura 2. Curvas de inhibición del crecimiento para las cepas de diatomeas <i>Nitzschia</i> sp1 (A), <i>Achnantheidium</i> sp (B), <i>Nitzschia</i> sp2 (C) y <i>Nitzschia</i> sp3 (D), a diferentes concentraciones de arsenato.....	23

CAPÍTULO II

Figure 1. Map of the geographical location of the Salar del Huasco (modified from Chong, 1988).....	31
Figure 2. Cell morphology <i>Nitzschia epithemioides</i> (CCM-UDEC 196). live cells observed in light microscope (LM), dorsal view (A), ventral view (B); Oxidized frustule observed in LM (C); Frustule ultrastructure observed in scanning electron microscope (SEM), external view of Sternum valve (SV) (D), internal view of SV (E). Cell morphology of <i>Nitzschia</i> sp (CCM-UDEC 297). live cells observed in LM, dorsal view (F), ventral view (G); Oxidized frustule observed in LM (H); Frustule ultrastructure observed in SEM, external view of SV (I), internal view of SV (J).....	35
Figure 3. Growth curves for <i>Nitzschia epithemioides</i> (A) and <i>Nitzschia</i> sp (B) derived at different temperatures and incubated in f/2 medium at 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, with a 18:6 h light-dark cycle.	36
Figure 4. Growth curves for <i>Nitzschia epithemioides</i> (A) and <i>Nitzschia</i> sp (B) derived at different light intensities and incubated in f/2 medium at 20°C, with a 18:6 h light-dark cycle.....	37
Figure 5. Growth curves for <i>Nitzschia epithemioides</i> (A) and <i>Nitzschia</i> sp (B) cultures incubated in f/2 medium with different Na_2SiO_3 and H_2SeO_3 concentrations at 20°C and 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, with a 18:6 h light-dark cycle.....	38

CAPÍTULO III

Figure 1. Generic structure of arsenosugars. Structures are: (1) sugar-OH; (2) sugar- PO_4 ; (3) sugar- SO_3H ; (4) sugar- OSO_3H	53
Figure 2. Biomass determination of <i>Nitzschia epithemioides</i> in 2 l of culture containing different concentrations of phosphorus and arsenic as arsenate. (A) harvested cells on day 4, and (B) harvested cells on day 8 of the culture period.....	54
Figure 3. ICP-MS chromatogram of m/z 75 for standard mix of arsenic ^{(III)/(V)} , DMA ^(V) and MA ^(V) (solid line) and standard sugars (dashed line) (A), chromatogram for <i>N. epithemioides</i> water/ H_2O_2 extract exposed to 10 (solid line) and 1000 (dashed line) mg l^{-1} arsenic ^(V) using anion-exchange chromatography coupled to ICP-MS on day 4 of culture (B), and on day 8 of culture (C), chromatogram for <i>N. epithemioides</i> MeOH/DCM extract exposed to 10 (solid line) and 1000 (dashed line) mg l^{-1} arsenic ^(V) using cation-exchange chromatography coupled to ICP-MS on day 8 of culture (D). Peaks are labelled as follows: (1) sugar-OH; (2) As^{III} ; (3) DMA ^(V) ; (4) sugar- PO_4 ; (5) sugar- SO_3H ; (6) MMA ^(V) ; (7) sugar- OSO_3H ; (8) As^{V}	58
Figure 4. Possible arsenic lipid generic structure.....	61

RESUMEN

En el norte de Chile, el volcanismo cuaternario controla la calidad del agua de la mayoría de las hoyas hidrográficas de la zona, encontrándose compuestos con elevados contenidos de arsénico de origen natural en minerales, suelo, agua, vegetales y animales. Sin embargo, esta zona destaca por una fuerte actividad minera y procesos metalúrgicos, por lo que el arsénico puede ingresar al agua también por vía antropogénica. Para la mayoría de los organismos la exposición a metales pesados, por encima de una concentración umbral, puede ser extremadamente tóxica. Entre los de mayor importancia ecotoxicológica en los ambientes acuáticos se encuentra el arsénico. La captación y toxicidad de los metales pesados para los organismos acuáticos están influidas no sólo por su concentración; también son relevantes el tiempo de exposición y los factores bióticos y abióticos del ambiente.

Las diatomeas bentónicas de los cuerpos limnicos altoandinos, están expuestas a fuertes cambios de las variables físicas y químicas del ambiente. La información sobre la sistemática y ecología de las diatomeas bentónicas de este tipo de ambientes es escasa. En este estudio realizamos la identificación taxonómica y cultivos unialgales de dos taxa de diatomeas bentónicas, aisladas desde el Salar del Huasco, Altiplano del norte de Chile. Los resultados indicaron que las especies identificadas como *Nitzschia epithemioides* *Nitzschia epithemioides* Grunow in Cleve & Grunow (1880) y *Nitzschia* sp, presentaron altas tasas de crecimiento exponencial, altas densidades celulares y capacidad de tolerar diferentes condiciones de temperatura, densidad de flujo fotónico y concentración de silicatos y selenio, por lo que podrían utilizarse sin problema para iniciar investigaciones orientadas a evaluar la capacidad de estos taxa de bioconcentrar y biotransformar el arsénico inorgánico, ya que, laguna Huasco presenta elevadas concentraciones del metaloide en sus aguas (ca. 12 mg L⁻¹).

Para dar cumplimiento al objetivo general del estudio, cultivos axénicos de *N. epithemioides* fueron expuestos a diferentes concentraciones de fósforo equivalentes al medio de enriquecimiento f/2 y arseniato de sodio en concentraciones de 0, 10, 100 y 1000 mg L⁻¹. Los resultados obtenidos confirman la capacidad de *N. epithemioides* de tolerar elevadas concentraciones de arsénico. La concentración total de As más elevada al final del periodo de cultivo, fue de 115 a 10480 µg g⁻¹ (peso seco) en los cultivos expuestos a <0.1 y 1000 mg As^(V) L⁻¹ respectivamente, y concentración de fósforo equivalente al medio f/10. Los resultados de los análisis de especiación de As, indicaron que en promedio la especie predominante fue As^(V) (76 %), seguido por arsenolípidos del tipo OH-ribosa (23 %), una menor proporción de tres tipos de arsenoazúcares (1.27%) y DMA^(V) (0,06%).

La diatomea bentónica *Nitzschia epithemioides* aislada desde laguna Huasco, altiplano norte de Chile, presenta un alto potencial biológico para la remoción de arsénico en aguas contaminadas con el metaloide, y constituye una alternativa tecnológica de bajo costo, amigable con el medio ambiente y viable técnicamente a corto plazo. El presente estudio contribuye al avance en la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías y metodologías de remoción de arsénico en el agua y ecosistemas acuáticos, utilizando organismos no manipulados genéticamente y que naturalmente por las características particulares de su entorno han desarrollado varias estrategias para la detoxificación de metales y metaloides como el arsénico.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El arsénico (As) es clasificado como un metaloide (GESAMP 1986). Los tres electrones desapareados que As presenta en su estructura electrónica externa le permiten formar uniones covalentes con hidrogeno, carbono, oxígeno y azufre para formar una variedad de compuestos inorgánicos y orgánicos (Gorby 1994). El As es un constituyente de más de 245 minerales y ocupa el vigésimo puesto en la abundancia de elementos en la corteza terrestre. Erupciones volcánicas y otros procesos naturales son fuentes de elevadas concentraciones de As en el ambiente. Unas 17.150 t de As son emitidas a la atmósfera por volcanes, 27 t por los océanos, y en el rango de 125 a 3.345 t por la quema de madera y petróleo y por los incendios forestales de origen natural (Matschullat 2000). En áreas no influenciadas por actividades humanas la concentración de As en el aire, son de sólo unos pocos ng m^{-3} (Umweltbundesamt 1983). En el mar la concentración de As varía entre $0,09 \mu\text{g L}^{-1}$ y $24 \mu\text{g L}^{-1}$ (promedio: $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$), y en las aguas dulces entre $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ y $0,45 \mu\text{g L}^{-1}$ (máximo: 1mg L^{-1}) (Léonard 1991). En aguas termales y subterráneas As fué encontrado en concentraciones de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ hasta $5.000 \mu\text{g L}^{-1}$ (Rüde 1996). Aparte de las fuentes naturales, la contaminación de As en agua y suelo puede ser consecuencia de actividades humanas debido a (1) la eliminación de productos químicos de residuos industriales, (2) la fundición de minerales que contienen As, (3) la quema de combustibles fósiles, y (4) la aplicación de compuestos de As en diversos productos, especialmente en los últimos 100 años. La fundición de Cu, Ni, Pb y Zn, es la fuente antropogénica más importante de As, se estima que 62.000 t de As son emitidos anualmente por esta vía, donde el 80% de las emisiones corresponden a las fundiciones de Cu (McArthur *et al.* 2001).

La presencia de elevadas concentraciones de arsénico en las aguas naturales es un problema a nivel mundial, ya que la ingesta crónica de estas aguas causa efectos adversos a la salud; decenas a millones de personas han sido afectadas por la exposición a aguas con arsénico. Entre las áreas con mayor población y extensión geográfica implicadas destacan, en Asia el Golfo de Bengala en Bangladesh y noreste de la India (Rahman *et al.* 2001; Bhattacharya *et al.* 2003), Mongolia Interior en China (Guo *et al.* 2001), Taiwán y Vietnam (Smedley & Kinniburgh 2002). En Europa, destacan Hungría y Rumanía (Gurzau & Gurzau 2001). En América esta problemática está siendo afrontada en Norteamérica en Canadá, Estados Unidos (BEST 2001) y México (Rodríguez *et al.* 2004); y en Sudamérica en Argentina, Chile, Bolivia y Perú (Fernández-Turiel *et al.* 2005). En el Cono Sur-Americano, As en el agua en concentraciones superiores a los $50 \mu\text{g L}^{-1}$ y consecuente riesgo de padecer arsenismo, salvo casos locales de contaminación (explotaciones mineras, fundiciones), es de origen natural y está relacionado con el volcanismo y la actividad hidrotermal asociada a la cordillera de los Andes entre los 14° y 28° latitud Sur. La vía de incorporación más habitual de As en el hombre es a través del agua de consumo, si bien la dieta y la inhalación por vía respiratoria pueden contribuir en menor grado. En las zonas con aguas arsenicales es común observar que los vegetales presentan concentraciones de As también elevadas y que el ganado también padece los efectos de la arsenicosis (Queirolo *et al.* 2000a; Sancha & Frenz 2000). Entre los casos más emblemáticos y con mayor repercusión mundial de afectación por As en agua en Sudamérica destaca el de Bell Ville en Córdoba (Argentina) y el de Antofagasta en el norte de Chile. Desde principios de los sesenta se observaron los

dramáticos efectos de la ingesta crónica de agua arsenical en Antofagasta (Pizarro & Balabanoff, 1973; Puga et al. 1973; Klohn, 1974; Borgoño et al. 1977; Smith et al. 1998; Karcher et al. 1999; Ferreccio et al. 2000; Sancha & Frenz, 2000; Sancha et al. 2000; Hopenhayn-Rich et al. 2000; Bates et al. 2004; Christian & Hopenhayn, 2004; Cáceres et al, 2005). Debido a la escasez de agua en la zona, se condujo el transporte de agua desde el río Toconce en los Andes. Resultó que esta agua tenía altas concentraciones de As (800 µg/L promedio) y ya en los primeros años sesenta comenzaron a manifestarse efectos cutáneos por consumo, especialmente en los niños. La construcción de plantas de tratamiento en Antofagasta (1970) y Calama (1978), disminuyó la concentración media de As en agua a 40 µg/L mitigando los efectos del As (Rivara et al. 1997; Sancha, 1999). Aunque el incidente de Antofagasta es el mejor documentado por la población implicada y tiempo de exposición, las aguas con elevadas concentraciones de As son frecuentes en todo el norte de Chile. Al sintetizar sobre una mapa la distribución de las aguas con elevado contenido de As en Chile, se obtiene prácticamente un continuo noroeste-sureste que abarca las regiones de Arica y Parinacota, Tarapacá, Antofagasta, Atacama y Coquimbo. Los arroyos de la zona, así como pozos poco profundos, son utilizados además de para el consumo humano para regadío. Esta agua frecuentemente contienen varios centenares de µg/L de As (Queirolo et al. 2000b).

La precipitación de esta zona hiperárida es mínima, por lo que el agua superficial tiene su origen en muchas ocasiones en manantiales termales. Ejemplos de cursos de aguas largos que alcanzan la costa son escasos (los ríos Lluta, Camarones y Loa). El resto del territorio es un desierto extremo con una red de drenaje poco desarrollada. El río Camarones discurre por la quebrada homónima en la región de Tarapacá, recoge las aguas de sus tributarios altioplánicos y no siempre las desemboca al mar. Las aguas de este río por lo general exceden los 500 µg/L de As, llegando en ocasiones hasta los 2000 µg/L. En pozos se han encontrado concentraciones de 200 a 1000 µg/L. Las variaciones de las concentraciones a lo largo del tiempo del agua del río se relacionan con cambios en la cantidad y localización de las raras precipitaciones (Mansilla & Cornejo Ponce, 2002). El río Loa es el más largo de la zona (440 km). Suministra agua a una población de aproximadamente 420.000 habitantes, así como a la industria minera y a la agricultura. El contenido medio de As es de 1400 µg/L y el de B de 21 mg/L. El aporte de estos elementos es fundamentalmente a través del río Salado que nace en el campo geotérmico de El Tatio. Además de este aporte natural, los residuos mineros y de fundiciones y sus emisiones atmosféricas también contribuyen a la concentración de este elemento en el agua (Romero et al. 2003).

El estado de oxidación del As (-3, 0, +3 y +5), y por tanto su movilidad, están controlados fundamentalmente por las condiciones redox y el pH del medio hídrico. Como aproximación, y sin tener en cuenta otros factores como el contenido de materia orgánica, en condiciones oxidantes, el estado As^(V) predomina sobre As^(III), encontrándose fundamentalmente como H₂AsO₄⁻ a valores de pH bajos (inferiores a 6,9), mientras que a pH más alto, la especie dominante es HAsO₄²⁻ (en condiciones de extrema acidez, la especie dominante será H₃AsO₄⁰, mientras que en condiciones de extrema basicidad, será AsO₄³⁻). En condiciones reductoras el arsénico se encuentra fundamentalmente como As^(III) y la especie disuelta dominante es H₃AsO₃⁰ a valores de pH más amplios (extrema acidez a pH 9).

Otros factores, como la concentración de determinados elementos, también controlan la especiación de As y por tanto su movilidad. Por ejemplo, en presencia de concentraciones altas de azufre, predominan las especies acuosas de azufre y arsénico; si en ese caso se establecen condiciones reductoras y ácidas, precipitarán sulfuros de arsénico (Brookins 1988; Yan *et al.* 2000; Smedley & Kinniburgh 2002). Por otra parte, la evaporación, potenciada en zonas áridas y semiáridas, favorece el aumento de la salinidad y de la alcalinidad y por tanto del As. Sin embargo se ha observado en aguas subterráneas que las concentraciones de As y cloruro presentan una correlación negativa (Smedley *et al.* 2002).

Las formas orgánicas de arsénico suelen aparecer en concentraciones menores que las especies inorgánicas. El As inorgánico puede ser convertido a especies metiladas catalizadas por una serie de organismos (hongos, bacterias y algas) en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Las formas orgánicas dominantes son el ácido dimetilarsínico (DMAA, $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$) y el ácido monometilarsínico (MMAA, $(\text{CH}_3)\text{AsO}(\text{OH})_2$), donde el As está presente en ambos casos como As^{V} (Hasegawa *et al.* 1999). Además se han incrementado las evidencias de que los procesos microbiológicos pueden estar implicados en la movilidad del As cuando hay una actividad microbiológica relevante, debido a que el estado de oxidación-reducción del medio, incluyendo el del As, puede verse afectado. Por ejemplo, la presencia de arsenito puede ser mantenida en condiciones óxicas por reducción biológica de arsenato (Oremland *et al.* 2004; Oremland & Stolz 2005). La biometilación y biorreducción son probablemente las transformaciones ambientales más importantes de As, ya que pueden producir especies organometálicas que son suficientemente estables para ser móviles en aire y agua (IPCS/WHO 1992). Ambos procesos bióticos (por acción de bacterias y algas) y procesos abióticos contribuyen a la metilación del As.

Para la mayoría de los organismos la exposición a metales pesados, por encima de una concentración umbral, puede ser extremadamente tóxica. Los de mayor importancia ecotoxicológica en los ambientes acuáticos son: mercurio, arsénico, cromo, plomo, cadmio, níquel y zinc. Los iones de estos elementos suelen penetrar en la célula a través de los mismos sistemas de transporte que utilizan otros cationes metálicos fisiológicamente importantes (Calcio, magnesio, cobre y zinc). La captación y toxicidad de los metales pesados para los organismos acuáticos están influidas no sólo por su concentración; también son relevantes el tiempo de exposición y los factores bióticos y abióticos del ambiente (Dawson & Ballatori 1995; Markert 1998; Wilken 1998). Considerando un modelo general, la interacción de un metal con la biota acuática, puede plantearse como un proceso que involucra los siguientes pasos: (1) la especiación en el ambiente, (2) las interacciones con la membrana plasmática en la interfase organismo-ambiente y (3) la partición del elemento en los compartimentos del organismo y los efectos biológicos resultantes de su interacción con los receptores en los sitios de acción (Di Toro *et al.* 2001). La toma de iones metálicos por las algas del fitoplancton, depende de la concentración del ion libre y su biodisponibilidad, es decir, que éste no se encuentre formando complejos con otras sustancias inorgánicas u orgánicas o se incorpore a precipitados (Figura 1). La concentración del ion metálico dentro de la célula depende de la disponibilidad de ligandos portadores o "Carriers" (Stumm & Morgan 1995), la velocidad del transporte a través de la membrana y posiblemente de la velocidad de transporte fuera de la célula. Una vez en el interior de la célula algal, el ion metálico puede intervenir en

procesos bioquímicos o ser atrapado en formas inactivas (complejado por fitoquelatinas y metalotioneínas), como una forma de detoxificación.

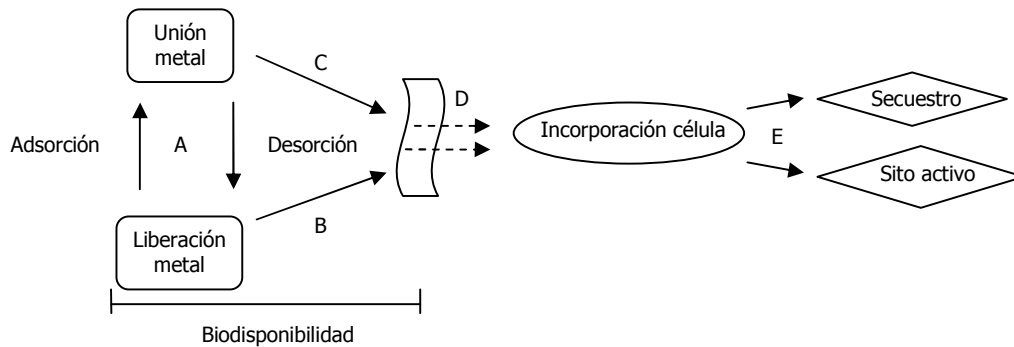


Figura 1. Proceso de biodisponibilidad (A-D). A, representa la formación de complejos por el metal en su forma más accesible; B y C, describen el transporte del metal hacia la membrana celular; D, representa absorción de un metal a través de la membrana y E, incorporación a los compartimentos celulares y sus respectivas respuestas metabólicas.

La localización de As en el sistema periódico directamente debajo de fósforo predice una analogía química para el comportamiento de arsenato y fosfato incluyendo su incorporación dentro de moléculas orgánicas. Sin embargo, no es reconocido el uso de arsénico en sistemas enzimáticos y podría potencialmente interferir en numerosos mecanismos biológicos normalmente dependientes de fósforo, por ejemplo el agotamiento o la inhibición de la adenosina trifosfato (ATP) (Meharg & Hanley-Whilaker 2002). Esto sugiere que los organismos tienden a desarrollar mecanismos de aislamiento y detoxificación para arsénico produciendo compuestos metilados (mono-, di-, y trimetil arsénico) y compuestos organo-arsenicales más elaborados (arsenobetaina, arsenocolina, arsenoribosomas y arsenofosfolípidos), que son mucho menos tóxicos que las formas inorgánicas (Anderson & Bruland 1991).

Se ha demostrado que ciertos productos químicos y metales pesados o metaloides tienen la capacidad de ser bioconcentrados en los organismos directamente del agua, bioacumulables y biomagnificados dentro de las cadenas tróficas, causando que los organismos de niveles tróficos superiores puedan contaminarse con altas concentraciones de sustancias químicas o metales que se encuentran en su presa (Konasewich *et al.* 1982; Williams & Krueger 1988; Morrison *et al.* 1996; Jarman *et al.* 1996; Nakata *et al.* 1998; Gobas *et al.* 1999; Bard 1999; Lee *et al.* 2000; Hayteas & Duffield 2000; Hargrave *et al.* 2000). La bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación de los contaminantes químicos en el ambiente acuático, son procesos dinámicos que involucran muchas variables interrelacionadas. Por ejemplo, el potencial de los metales pesados o metaloides de bioconcentración, bioacumulación o biomagnificación en los organismos y tramas tróficas depende de las propiedades del compuesto (p.e., hidrofobicidad, lipofilia, y resistencia a la degradación), factores ambientales (p.e., salinidad, temperatura, concentración de otros químicos, y potencial redox), factores bióticos (p.e., el

modo de alimentación de un organismo, la posición trófica, la concentración de lípidos y metabolismo) y la biodisponibilidad (p.e., entradas actuales del químico, mecanismos de transporte, y el grado de contaminación) (Konasewich *et al.* 1982; Malins *et al.* 1982; Morrison *et al.* 1996; Gobas *et al.* 1999; Lee *et al.* 2000; Shin & Lam 2001). Hargrave *et al.* (2000) indicaron que los productores primarios planctónicos toman los metales pesados o metaloides directamente del agua, a través de bioconcentración y reportan que se han encontrado Factores de Bioconcentración (FBCs) para fitoplancton en el orden de $10^4 - 10^6$ en base a peso húmedo ($10^4 - 10^8$ de peso en lípidos), lo que indica que el fitoplancton bioconcentra los contaminantes químicos en concentraciones de $10^4 - 10^6$ veces más que las concentraciones del ambiente acuático. Otros reportes indican que la bioconcentración de arsénico en algas unicelulares, alcanza hasta 3000 veces la concentración en el agua circundante y que la bioconcentración de arsénico bajo condiciones de laboratorio en organismos acuáticos, principalmente microalgas y pequeños invertebrados dulceacuícolas, presentan factores de bioconcentración (FBCs) para varios compuestos de arsénico, generalmente en amplios rangos, desde 20 a sobre 1000 dependiendo de la especie de cada organismo, concentración de arsénico y tiempo de exposición (Magos 1990; IPCS/WHO, 1992).

A pesar de los avances en los tratamientos convencionales para la eliminación de As, hay una necesidad apremiante de nuevas metodologías y de una forma más rentable de remoción de As de las aguas. Los tratamientos biológicos, surgen como otra alternativa de eliminación de As del agua, basada en la utilización de plantas y microorganismos que desempeñan un importante papel en la movilidad del As en el agua y remoción del metaloide (Cervantes *et al.* 1994; Cobbett & Goldsbrough 2002; Perales-Vela *et al.* 2006). Sin embargo, para la aplicación efectiva de estas alternativas tecnológicas, es necesario realizar más investigaciones para explorar la potencialidad de tales procesos.

Debido a que las microalgas han desarrollado varias estrategias para la bioconcentración y detoxificación de metales y metaloides como el As. El objetivo general de esta investigación fue evaluar la capacidad de diatomeas bentónicas extraídas desde laguna Huaco, cuerpo de agua altiplánico del norte de Chile, con elevadas concentraciones del metaloide de origen natural, como biorremediadores de aguas contaminadas con arsénico.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las diatomeas bentónicas del salar del Huasco, Altiplano norte de Chile, presentan una alta tolerancia a elevadas concentraciones de arsénico de origen natural. Considerando la resistencia de estas diatomeas a elevadas concentraciones del metaloide en aguas salinas naturales, estas deberían poseer la capacidad de bioconcentrar y biotransformar el arsénico inorgánico a especies menos tóxicas de arsénico orgánico en cultivos, lo cual podría permitir su uso como microorganismos para remediación de aguas con alto contenido de sales y arsénico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la capacidad de diatomeas bentónicas extraídas desde laguna Huasco, cuerpo de agua altiplánico del norte de Chile, con elevadas concentraciones del metaloide de origen natural, para bioconcentrar y biotransformar el arsénico inorgánico para actuar a futuro como potenciales biorremediadores de aguas contaminadas con el metaloide.

Objetivos específicos / Capítulos asociados

1. Seleccionar los taxa de diatomeas que se evaluarán como potenciales biorremediadores de aguas con elevadas concentraciones de arsénico inorgánico.

- Capítulo I: Eimmy E. Ramírez, Ana S. Cifuentes, Ingrid Inostroza & Roberto E. Urrutia. (En preparación). Toxicidad del arsenato para cuatro cepas de diatomeas bentónicas aisladas del Salar del Huasco (Norte de Chile, 20° S) bajo condiciones de laboratorio.

2. Optimizar los parámetros fisicoquímicos y requerimiento de nutrientes para el cultivo de las diatomeas seleccionadas como biorremediadores de aguas con elevadas concentraciones de arsénico inorgánico.

- Capítulo II: Ramírez, E.E., Gonzalez, M.A., Cifuentes, A.S., Inostroza, I. & Urrutia, R.E., (Accepted). Culture and growth of two benthic diatoms species isolated from the Salar del Huasco (North of Chile, 20° S) at different conditions of temperature, light and nutrient. *Gayana Botánica*.

3. Determinar la capacidad de bioconcentración y biotransformación de arsénico inorgánico a compuestos menos tóxicos en la diatomea *Nitzschia epithemioides* con mayor tolerancia al metaloide.

- Capítulo III: Eimmy E. Ramírez^{1*}, Jörg Feldmann², Andrea Raab² & Roberto E. Urrutia¹. (Submitted). Bioconcentration and biotransformation of arsenate by benthic diatom *Nitzschia epithemioides* Grunow in Cleve & Grunow (1880) under different phosphate concentrations. *Aquatic Toxicology*.

CAPÍTULO I

Toxicidad del arsenato para cuatro cepas de diatomeas bentónicas aisladas del Salar del Huasco (Norte de Chile, 20° S) bajo condiciones de laboratorio.

Eimmy E. Ramírez^{1*}, Ana S. Cifuentes², Ingrid Inostroza² & Roberto E. Urrutia¹.

¹Aquatic Systems Unit/Environmental Science Center EULA-Chile, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

²Botany Department/ College of Natural Sciences and Oceanography, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

*Autor para correspondencia: eimmy.ramirez@udec.cl; Fono: +56 41 2204054, Fax: +56 41 2207076

En preparación:

RESUMEN

En el presente estudio se determinó la toxicidad del arsenato sobre cuatro cepas de diatomeas bentónicas aisladas desde un ambiente con elevadas concentraciones de As de origen natural. Para ello, se evaluó el porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento y densidad celular de las diatomeas expuestas a diferentes concentraciones de arsenato. El mayor porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento fue para las cepas de diatomeas *Nitzschia* sp1 con un 93% a 1000 mg l⁻¹ As^(V), y *Achnanthydium* sp con 100% a 1000 mg l⁻¹ As^(V), en ensayos de 96 h. Las cepas *Nitzschia* sp2 y *Nitzschia* sp3, presentaron el menor porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento con sólo un 8% a 1000 mg l⁻¹ As^(V); y un 4% a 1000 mg l⁻¹ As^(V), para cada cepa en un período de exposición de 7 días. Este estudio también demuestra que las diatomeas en estudio poseen diferentes capacidades para tolerar el arsénico a pesar de ser aisladas de un entorno en común con las mismas variables físicas y químicas del ambiente.

INTRODUCCIÓN

El arsénico es un metaloide nocivo distribuido universalmente en los ecosistemas acuáticos (Smedley & Kinniburgh 2002). Su rango de concentración varía desde <1 a 5000 µg/l y podría incluso alcanzar los 850000 µg/l en los drenajes mineros (Nordstrom & Alpers 1999). En aguas oxigenadas el arsénico se encuentra predominantemente como arsenatos aniónicos (H₂AsO₄⁻ y HAsO₄²⁻) con no más de un 15-20% como arsenito neutro As(OH)₃ (Neff 1997; Francesconi 2005). Varios factores físico-químicos y biológicos pueden influir en la bioacumulación y toxicidad de las diferentes especies de arsénico en los microorganismos. El contenido de fosfato del medio, pH, potencial redox, temperatura e intensidad de la luz, afectan la bioabsorción y toxicidad del arsénico (Yamaoka *et al.* 1999; Pawlik-Skowronska *et al.* 2004). La capacidad de los microorganismos para acumular, transformar y detoxificar el arsénico

también influye la toxicidad del arsénico (Neff 1997; Goessler *et al.* 1997; Yamaoka *et al.* 1999).

Teóricamente, las algas pueden responder de varias maneras para aplacar la toxicidad del arsenato. En primer lugar, la afinidad o el número de transportadores de arsenato en la superficie pueden disminuir y su contenido intracelular es así reducido a través de la regulación de la absorción (Karadzhova *et al.* 2008). La acumulación de arsenato podría ser controlada adicionalmente por su excreción fuera de las células (Gupta *et al.* 2011). En segundo lugar, el arsenato podría reducirse a arsenito que luego es liberado al ambiente, incorporarse a compuestos que contienen azufre (por ejemplo, glutatión y fitoquelatinas), o metilado a especies orgánicas menos tóxicas (Pawlik-Skowronska *et al.* 2004; Zhao *et al.* 2009). En tercer lugar, la distribución subcelular de arsenato podría variar en función de su concentración ambiental que podría también alterar su toxicidad (Duncan *et al.* 2010; Miot *et al.* 2009). Para el caso del As, la localización de este elemento en el sistema periódico directamente debajo de fósforo predice una analogía química para el comportamiento de arsenato y fosfato incluyendo su incorporación dentro de moléculas orgánicas. Sin embargo, no es reconocido el uso de arsénico en sistemas enzimáticos y podría potencialmente interferir en numerosos mecanismos biológicos normalmente dependientes de fósforo, por ejemplo el agotamiento o la inhibición de la adenosina trifosfato (ATP) (Meharg & Hanley-Whilaker 2002). Esto sugiere que los organismos tienden a desarrollar mecanismos de aislamiento y detoxificación para el arsénico produciendo compuestos metilados (mono-, di-, y trimetil arsénico) y compuestos organo-arsenicales más elaborados (arsenoribosomas, arsenofosfolípidos, arsenobetaina y arsenocolina), que son mucho menos tóxicos que las formas inorgánicas (Anderson & Bruland 1991; Murray *et al.* 1991).

No obstante, la bioabsorción y toxicidad de las especies de arsénico inorgánico continúa en controversia. Varios documentos científicos informan que las microalgas marinas son más sensibles a As (III), mientras que las algas de agua dulce son más sensibles a As (V) (Knauer *et al.* 1999; Yamaoka *et al.* 1999; Levy *et al.* 2005; Karadzhova *et al.* 2008). Sin embargo, también se han reportado muchas excepciones a esta regla. La microalga marina *Dunaliella* sp. y *Polyphysa peniculus* fueron más sensibles a As (V) que a As (III) (Cullen *et al.* 1994; Takimura *et al.* 1996). As (V) y As (III) ejercen igual toxicidad para el alga de agua dulce *Stichococcus bacillaris* a pH 8,2 con niveles de fosfato entre 0,03 y 0,3 mg P L⁻¹ (Pawlik-Skowronska *et al.* 2004). Igual toxicidad de As (III) y As (V) se determinó a partir de ensayos de inhibición de crecimiento algal de 72h para el alga de agua dulce *Chlorella* sp. (pH 7,6) (Levy *et al.* 2005). Mientras que As (V) fue más tóxico que As (III) para *Monoraphidium arcuatum* (pH 7,6). Una disminución en la toxicidad de As (V) se encontró para las algas de agua dulce *Chlorella* sp. y *M. arcuatum* en medio de cultivo que contiene 0,5 mg P L⁻¹ (Levy *et al.* 2005). En general, dependiendo del microorganismo y las características fisicoquímicas del medio, el reporte de la EC₅₀ (es decir, las concentraciones que reducen en un 50% el crecimiento de las células) para las microalgas verdes varía a lo largo de un intervalo de concentración de más de cuatro órdenes de magnitud (desde 0,3 μM a 4 μM de arsénico) (Ismail *et al.* 2002). Otros reportes sobre la toxicidad de As para las microalgas de agua dulce están limitados a clorófitas y cianobacterias, reportándose un 50% de inhibición en el crecimiento (IC₅₀) de estos organismos, a concentraciones desde 0.048 a 202 mg/L (Jurewicz & Buikema 1980; Fargosová 1994). Murray *et al.* (2003), concluye que el alga *Chlorella vulgaris* sobrevive a concentraciones de arsenato hasta 1000 mg/l. La absorción de As por las microalgas en ambientes contaminados con el metaloide a menudo exceden ampliamente las concentraciones encontradas en

ambientes no contaminados (Planas & Healey 1978; Sanders & Windom 1980; Cullen et al. 1994). Lo que demuestra, que las microalgas tienen una alta capacidad de acumular As, pueden influir en la concentración de arsénico total y en la proporción de especies de As inorgánicas y orgánicas del medio que las rodea.

El objetivo del presente estudio fue determinar la toxicidad del arsenato sobre cuatro cepas de diatomeas bentónicas aisladas desde un ambiente con elevadas concentraciones de As de origen natural. A futuro se realizará con la microalga que presente la mayor tolerancia a arsenato, experimentos para los análisis de cuantificación, especiación, y biotransformación de arsenato correspondientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

LUGAR DE MUESTREO

Muestras de agua, sedimento y microalgas fueron colectadas desde la zona norte de laguna Huasco, Salar del Huasco, cuerpo de agua del Altiplano, norte de Chile ($20^{\circ}17'30''\text{S}$; $68^{\circ}52'20''\text{O}$; Fig. 1), debido a que este sector está conectado con una vertiente generando un gradiente escorrentía- confinamiento que permite las mayores concentraciones de arsénico de la laguna, cuya máxima profundidad alcanza los 40 cm y presenta características fisiográficas y climáticas particulares (Risacher *et al.* 2003). La toma de muestras se realizó estacionalmente: en época seca (Noviembre de 2008); poslluvia (Abril de 2009); y seca-fría (Agosto de 2009).

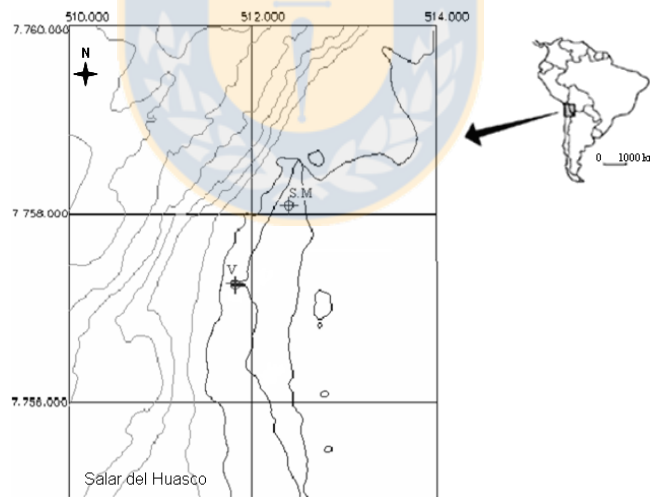


Figura 1. Mapa de sitio de muestreo en sector norte de laguna Huasco, Salar de Huasco, norte de Chile.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AS

Las muestras de agua fueron colectadas en envases de polietileno con 1ml/L de ácido nítrico concentrado para los análisis de As. Las muestras fueron transportadas refrigeradas al laboratorio y se mantuvieron a baja temperatura (4°C) hasta el día del análisis. Los sedimentos fueron secados y tamizados a $63\ \mu\text{m}$ para el proceso digestivo de 1 g de sedimento con HCl y HNO_3 (3:1 v/v) siguiendo la metodología descrita por Herrera (2002). Las muestras de fitoplancton obtenidas del filtrado

simultaneo a 58 y 20 μm (para separar el fitoplancton del zooplancton) de 60 l de agua de la interfase agua-sedimento, fueron depositadas en enbases de polietileno por medio de la remoción del material colectado con agua destilada, obteniéndose un volumen aproximado de muestra de 300 ml y se fijó con formalina al 5%. Para los análisis de cuantificación de As total, las muestras fueron agitadas a 150 rpm durante 20 minutos, posteriormente el residuo fue llevado a sequedad a 105 °C en estufa. Se pesó 1 g de muestra seca para la digestión ácida con la mezcla HNO_3/HF (4:1 v/v), se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 16 h, luego la extracción de solventes se realizó por evaporación a sequedad a 50 °C por 3 h. Posteriormente se añadió a la mezcla ácida 400 μl de H_2O_2 al 30% y se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 24 h. Finalmente los solventes fueron evaporados a sequedad a 68 °C por 5 h.

INSTRUMENTACIÓN

La cuantificación de arsénico total se realizó mediante espectroscopia de absorción atómica acoplada a un sistema de generación de hidruros, en un equipo SpectrAA-50/55 Varian. Las condiciones de los parámetros instrumentales para la cuantificación de arsénico se indican en la tabla I.

Tabla I. Condiciones de parámetros instrumentales para cuantificación de arsénico mediante HG-AAS.

Condiciones operativas	Características
Agente reductor	NaBH_4 0.6% (p/v) en NaOH 0.5% (p/v) Flujo: 1 ml por minuto
Solución HCl	HCl 6 M Flujo: 1 ml por minuto
Muestra	Flujo: 7 ml por minuto
Pre-reducción	KI 10% (p/v) y HCl ©
Gas arrastre	N_2 extra puro
Longitud de onda	193.7 nm
Ancho rendija	0.5 nm
Concentración para 0.2 Abs.	0.3 mg l^{-1}
Corriente lámpara cátodo hueco As	10 Ma
Corrección de fondo	Lampara de deuterio
Tipo de combustible	Aire/acetileno
Flujo aire	10.00 l min^{-1}
Flujo acetileno	2.10 l min^{-1}

COLECTA, AISLAMIENTO Y ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO UNIALGALES

Este ecosistema de altura esta sujeto a fuertes vientos y debido a que la profundidad de laguna Huasco en el sitio de colección no superaba los 10 cm, fue posible obtener las microalgas más el sedimento fino en suspensión por medio del filtrado a 20 μm de abertura de malla. El material retenido, fue depositado en envases de polietileno y transportado en frío al laboratorio.

Para establecer los cultivos unialgales, se utilizó el método de aislamiento por pipeteo y lavados sucesivos, de acuerdo al protocolo descrito por Andersen Capitulo 6 (2005). Básicamente se trabajó con

portaobjetos excavados (más de una depresión) o directamente sobre gotas (con medio de cultivo) puestas sobre un portaobjetos normal (gotas en hileras) utilizando un microscopio invertido (Nikon TS 100). Mediante pipetas Pasteur estériles se procedió a aislar y lavar una a una las unidades algales para posteriormente depositarlas en tubos de ensayo o placa Petri con medio de cultivo f/2 de Guillard (Guillard 1975). Finalmente cultivos unialgales no-axénicos de los taxa crecieron en matraces Erlenmeyer de 250 ml (ca. 50 ml volumen cultivo) utilizando medio de cultivo f/2 según Guillard, 1975 (pH 8.00, salinidad=30 PSU), incubados a $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (LI-250 Light Meter, LI-COR. U.S.A.), a $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y con un ciclo 18:6 h L:O.

IDENTIFICACIÓN DE LAS DIATOMEAS

La identificación taxonómica, se realizó en base a las características morfológicas distintivas de cada taxón (Hustedt 1976; Krammer & Lange-Bertalot 1988, 1991, 2000, 2004). La morfología y los datos sobre las dimensiones celulares de las diatomeas vivas se obtuvieron utilizando un microscopio fotónico Olympus (modelo CX 31. Cámara, 518CU 5.0M CMOS). Para remover la materia orgánica de los frústulos, pequeños volúmenes de cultivo fueron lavados con ácidos de acuerdo a la metodología propuesta por Hasle & Fryxell (1970).

CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LOS BIOENSAYO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO

La determinación de la inhibición del crecimiento en las cepas de diatomeas en estudio por efecto de arsenato como Na_2HAsO_4 a concentraciones de 0 a 1000 mg l⁻¹. Se realizó siguiendo los procedimientos y preparación de soluciones nutrientes descritos en la Norma Chilena Oficial Nch 2706 (2002), remplazando el agua del medio de cultivo por agua de mar filtrada a $0,45 \mu\text{m}$ en membrana de nitrocelulosa y autoclavada a 120°C por 20 minutos, enriquecida con Si ($1.06 \times 10^{-4} \text{ M Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$), macronutriente necesario para el crecimiento de las diatomeas. Un inoculó de $1 \times 10^{-4} \text{ cel ml}^{-1}$ de cada cepa fueron incubados a $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en sistema de cultivo modo batch.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para determinar las diferencias significativas entre las tasas de crecimiento y densidades celulares de las diatomeas en los tratamientos con diferentes concentraciones de arsenato, se realizaron comparaciones mediante análisis de varianza de una-vía (ANOVA), seguido de comparaciones múltiples por un test de Tukey's. Un valor p de <0.05 se consideró como significativo. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el Software SigmaPlot, versión 11.0 (Systat Software Inc.).

RESULTADOS

CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN LAS MATRICES AMBIENTALES ABIÓTICAS Y BIÓTICAS

La concentración de arsénico total determinada en aguas y fitoplancton, fueron mayores en época de alta tasa de evaporación del acuífero (Noviembre) y disminuyeron en épocas de poslluvia (Abril) y seca-fría (Agosto). Los sedimentos no presentaron diferencias significativas en la concentración de arsénico en las distintas épocas evaluadas (Tabla II).

Tabla II. Concentraciones de arsénico total en matrices abióticas y bióticas de laguna Huasco, Salar del Huasco.

Matriz	Concentración de arsénico (mg l ⁻¹)			Promedio
	Noviembre 2008	Abril 2009	Agosto 2009	
Agua	12,5±0,8	2,8±0,3	6,1±0,1	7,1±4,9
Sedimento	91±2	105±3	112±4	103±11
Fitoplancton	213±6	127±10	163±30	168±43

BIOENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO

El mayor porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento fue para las cepas de diatomeas identificadas como *Nitzschia* sp 1 con un 0-93% a 10 y 1000 mg l⁻¹ As^(V), y *Achnanthydium* sp con un 4-100% a 0.1 y 1000 mg l⁻¹ As^(V), para un período de exposición de 96 h. Las cepas identificadas como *Nitzschia* sp 2 y *Nitzschia* sp 3, presentaron el menor porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento con un intervalo de sólo un 0-8% a 1 y 1000 mg l⁻¹ As^(V); y un -12-4% a 1 y 1000 mg l⁻¹ As^(V), para cada cepa en un período de exposición de 7 días. El efecto de las diferentes concentraciones de arsenato ensayadas sobre la densidad celular para cada cepa evaluada se observa en la figura 2.



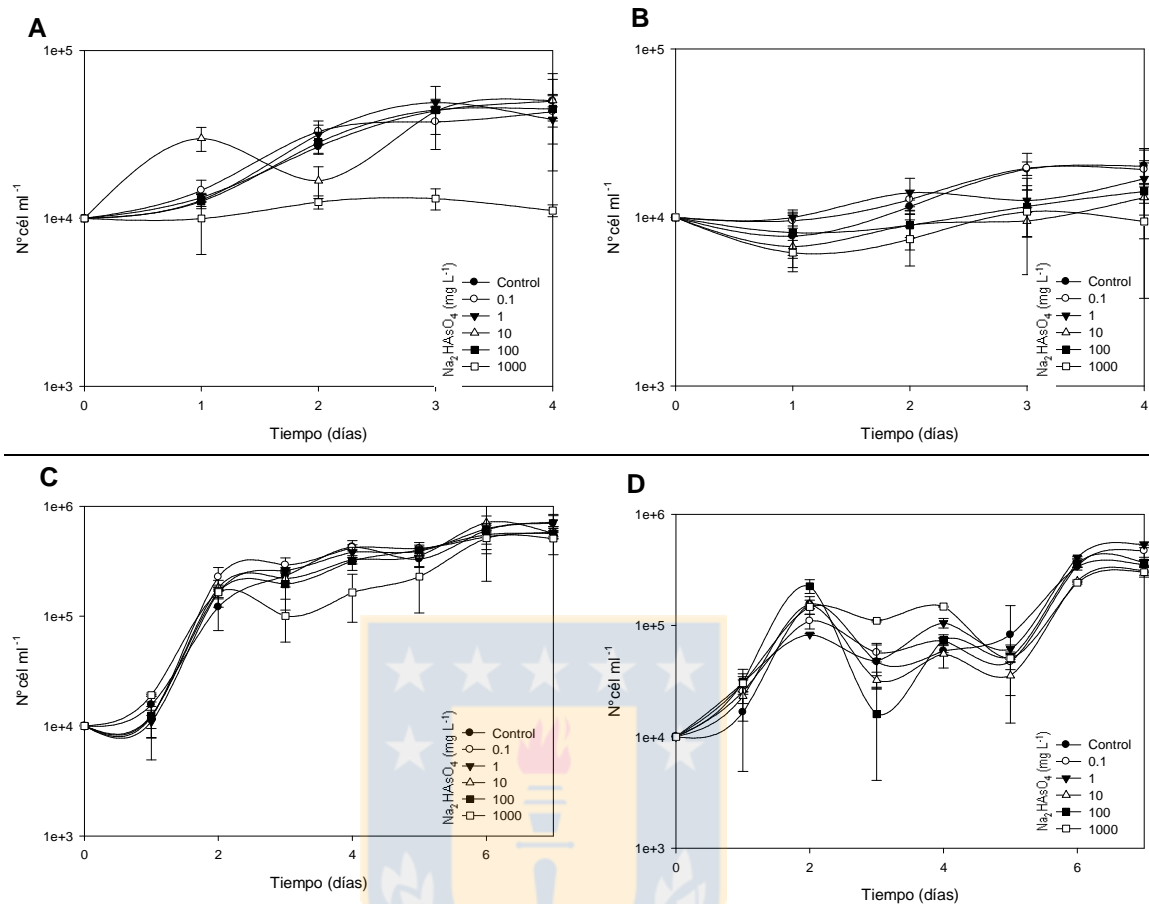


Figura 2. Curvas de inhibición del crecimiento para las cepas de diatomeas *Nitzschia* sp1 (A), *Achnanthydium* sp (B), *Nitzschia* sp2 (C) y *Nitzschia* sp3 (D), a diferentes concentraciones de arsenato.

DISCUSIÓN

Laguna Huasco, Salar del Huasco. Se caracteriza, por la salinidad y fluctuaciones estacionales de sus aguas con mayor evaporación que precipitación (Vila & Muhlhauser 1987; Risarcher et al. 2003). Durante la estación seca entre los meses de Agosto a Noviembre, presenta una alta tasa de evaporación y esta expuesta a elevada radiación electromagnética. Luego en temporada de lluvia producida por el invierno altiplánico, en los meses de Diciembre a Febrero, el salar es inundado por las precipitaciones intensas que se producen en este periodo. En temporada de poslluvia, las especies químicas que constituyen el acuífero incluido el arsénico se encuentran diluidas debido al aporte hídrico dejado por las lluvias. Esto ha producido sistemas acuáticos con características físico-químicas que dependen estrechamente de la disponibilidad de agua (Chong 1988; Keller & Soto 1998; Risarcher et al. 2003). Es por ello, que en este ambiente extremo, solamente habitan organismos halófitos adaptados fisiológicamente a estas condiciones.

En este estudio se encontraron elevadas concentraciones de arsénico total para los organismos del fitoplacton, presentando un aumento en la concentración total de arsénico, en el mes de Noviembre, época seca ($213 \pm 6 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ As}$). La concentración de arsénico total en los organismos fitoplanctónicos disminuyó en Abril, época de poslluvia y nuevamente se elevó en agosto, época seca-fría, lo que demuestra que la concentración de As está determinada por el aumento o disminución de la concentración del metaloide en los componentes del medio acuático. Sin embargo, no es posible determinar en este estudio, el comportamiento del arsénico, ya que, este depende de las especies particulares en que se encuentre y la mayor reactividad de una especie no necesariamente coincidirá con la mayor concentración del metal en determinada forma química. De allí que el comportamiento de un elemento, en el ambiente (biodisponibilidad, toxicidad, distribución) no pueda predecirse basándose en su concentración total (Bernhard *et al.* 1986).

Los resultados de los bioensayos con arsenato para las diferentes cepas de diatomeas en estudio indicaron que tanto *Nitzschia* sp2 como *Nitzschia* sp3 son capaces de tolerar elevadas concentraciones de arsenato, lo que sugiere que estas microalgas podrían haber desarrollado uno o varios mecanismos de detoxificación para arsenato al estar expuestas a altas concentraciones de arsénico en su entorno natural, como se ha demostrado en estudios previos bajo condiciones de laboratorio (Anderson & Bruland 1991; Murray *et al.* 1991, Foster *et al.* 2008). No obstante, este estudio demuestra que las especies de microalgas en estudio poseen diferentes capacidades para tolerar el arsénico a pesar de ser aisladas en un entorno común con las mismas variables físicas y químicas del ambiente (Figura 2).

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Fabiola Cruces (Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Chile) por su ayuda en la identificación taxonómica de los taxa de diatomeas en estudio y al grupo de investigación microalgal FICOLAB. Este trabajo fue financiado por Fondecyt N° 1.120.807 y el proyecto "CRHIAM / CONICYT / FONDAP / 15130015".

REFERENCIAS

- Andersen, R.A. 2005. Algal Culturing Techniques. Phycological Society of America, Elsevier Academic Press. Ed. Andersen R.A., Amsterdam. 578 pp.
- Anderson L.C.D., Bruland K. W. 1991. Biochemistry of arsenic in natural water: the importance of methylated species. *Environ Sci Technol*, 25, 420-427.
- Bernhard M., Brinckman F.E., Irgolic K.J. 1986. Why "Speciation". In: Bernhard, M., Brinckman F.E., Sadler P.J. (Eds.) *The Importance of Chemical Speciation in Environmental Processes*. Springer-Verlag. Berlin. p. 7-14.
- Cullen W.R, Harrison L.G, Li H, Hewitt G. 1994. Bioaccumulation and excretion of arsenic compounds

by a marine unicellular alga, *Polyphysa peniculus*. *Appl. Organomet. Chem.* 8, 313-324.

Chong G.D. 1988. The Cenozoic saline deposits of the Chilean Andes between 18°00' and 27°00' south latitude. In: Bahlburg, H., Breikreuz, C., Geise, P. (Eds.), *The Southern Andes. Lect. Notes in Earth Sci.*, vol. 17, 137-151.

Duncan E., Foster S., Maher W. 2010. Uptake and metabolism of arsenate, methylarsonate and arsenobetaina by axenic cultures of the phytoplankton *Dunaliella tertiolecta*. *Botanica Marina.* 53, 377-386.

Fargosová A. 1994. Comparative toxicity of five metals on various biological subjects. *Bull Environ Contam Toxicol.* 53, 317-324.

Foster S., Thomson D., Maher W. 2008. Uptake and metabolism of arsenate by anoxic cultures of the microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Chemistry* 108: 172-183.

Francesconi K. A. 2005. Current perspectives in arsenic environmental and biological research. *Environ. Chem.* 2, 141-145.

Goessler W., Lintschinger J., Szakova J., Mader P., Kopecky J., Douch J., Irgolic K.J. 1997. *Chlorella* sp. and arsenic compounds: an attempt to prepare an algal reference material for arsenic compounds. *Appl. Organomet. Chem.* 11, 57-66.

Gupta D.K., Srivastava S., Huang H.G., Romero-Puertas M.C., Sandalio L.M. 2011. In: Sherameti I., Varma A. (Eds.), *Detoxification of Heavy Metals*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Hasle G. R., Fryxell, G. A. 1970. Diatoms: cleaning and mounting for light and electron microscopy. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 89: 469-74.

Herrera V. 2002. Distribución y especiación de algunos elementos traza en salares andinos. I Región, Chile. Tesis de Doctorado. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

Hustedt F. 1930. Bacillariophyta (Diatomae). In: A. Pascher (eds.), *Die Süßwasser-flora Mitteleuropas*, vol. 10, pp. 466. Gustav Fischer, Jena.

Ismail M., Phang S.-M., Tong S.-L., Brown M.T.A. 2002. Modified toxicity testing method using tropical marine microalgae. *Environ. Monit. Assess.* 75, 145-154.

Jurewicz S, Buikema A.L. 1980. Effects of arsenate on algae, *Daphnia*, and mosquito fish. *VA J Sci.* 31, 124.

- Karadjova I.B., Slaveykova V.I., Tsalev D.T. 2008. The biouptake and toxicity of arsenic species on the green microalga *Chlorella salina* in seawater. *Aquatic Toxicology*. 87, 264-271.
- Keller B., Soto D. 1998. Hydrogeologic influences on the preservation of *Orestias ascotanensis* (Teleostei: Cyprinodontidae), in Salar de Ascotán, northern Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 71, 147-156.
- Knauer K., Behra R., Hemond H. 1999. Toxicity of inorganic and methylated arsenic to algal communities from lakes along an arsenic contamination gradient. *Aquatic Toxicology*. 46, 221-230.
- Krammer, K. & H. Lange-Bertalot. 1988. Bacillariophyceae 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. In: H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. G. Fischer, Jena.
- Krammer, K. & H. Lange-Bertalot. 1991. Bacillariophyceae 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. In: H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, 437 pp. Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Krammer, K. & H. Lange-Bertalot. 2000. Bacillariophyceae 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. In: H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, 598 pp. Fischer Verlag, Stuttgart, Stuttgart, Germany.
- Krammer, K. & H. Lange-Bertalot. 2004. Bacillariophyceae 4. Teil: Achnantheaceae Kritische Ergänzungen zu *Navicula* (Lineolatae) und *Gomphonema*. In: H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, G. Fischer, Jena.
- Levy J.L., Stauber J.L., Adams M., Maher W.A., Kirby J., Jolley D. 2005. Toxicity, biotransformation and mode de action of arsenic in two freshwater microalgae (*Chlorella* sp. And *Monoraphidium arcuatum*). *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (10), 2630-2639.
- Meharg A.A., Hanley-Whilaker J. 2002. Arsenic uptake and melabolism in arsenic-resislant and nonresistant planl species. *New Phytol* 154:29-43.
- Miot J., Morin G., Skouri-Panet F., Ferard C., Poitevin A., Aubry E., Ona-Nguema G., Juillot F., Guyot F., Brown Jr. G.E. 2009. Speciation of arsenic in *Euglena gracilis* cells exposed to As (V). *Environmental Science & Technology*. 43, 3315-3321.
- Murray L.A., Raab A., Marr I.L., Feldmann J. 2003. Biotransformation of arsenate to arsenosugars by *Chlorella vulgaris*. *Appl. Organomet. Chem.* 17, 669-674.
- Neff J.M. 1997. Review: ecotoxicology of arsenic in the marine environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:917-927.

Nordstrom D.K., Alpers C.N. 1999. Negative pH, efflorescent mineralogy, and consequences for environmental restoration at the Iron Mountain Superfund site, California. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96,3455-3462.

Pawlik-Skowronska B., Pirszel J., Kalinowska R., Skowronski T. 2004. Arsenic availability and direct role of GSH and phytochelatins in As detoxification in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Aquat. Toxicol.* 70, 201-212.

Planas D., Healey F.P. 1978. Effects of arsenate on growth and phosphorus metabolism of phytoplankton. *J. Phycol.* 14, 337-341.

Risacher F., Alonso H., Salazar C. 2003. The origin of brines and salts in Chilean salars: a hydrochemical review. *Earth-Science Rev.* Vol. 63(3-4), 249-293.

Sanders J.G., Windom H.L. 1980. The uptake and reduction of arsenic species by marine algae. *Estuar. Coast. Mar. Sci.* 10, 555-567.

Smedley P.L., Kinniburgh D.G. 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem.*, 17(5), 517-568.

Takimura O., Fuse H., Murakami K., Kamimura K., Yamaoka Y. 1996. Uptake and reduction of arsenate by *Dunaliella* sp. *Appl. Organomet. Chem.* 10, 753-756.

Vila I., Muhlhauser H. 1987. Dinámica de lagos de altura. Perspectivas de investigación. *Arch. Biol. Med. Exp.* 20, 95-103.

Yamaoka Y., Takimura O., Fuse H., Murakami K. 1999. Effect of glutathione on arsenic accumulation by *Dunaliella salina*. *Appl. Organomet. Chem.* 13, 89-94.

Zhao F.J., Ma J.F., Meharg A.A., McGrath S.P. 2009. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist.* 181, 777-794.

CAPÍTULO II

Culture and growth of two benthic diatoms species isolated from the Salar del Huasco (North of Chile, 20° S) at different conditions of temperature, light and nutrient.

Cultivo y crecimiento de dos especies de diatomeas bentónicas aisladas del Salar del Huasco (Norte de Chile, 20° S) a diferentes condiciones de temperatura, luz y nutrientes.

Eimmy E. Ramírez^{1*}, Mariela A. Gonzalez², Ana S. Cifuentes², Ingrid Inostroza² & Roberto E. Urrutia¹.

¹Aquatic Systems Unit/Environmental Science Center EULA-Chile, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

²Botany Department/ College of Natural Sciences and Oceanography, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

*Autor para correspondencia: eimmy.ramirez@udec.cl; Fono: +56 41 2204054, Fax: +56 41 2207076

Accepted: *Revista Gayana Botánica*.

ABSTRACT

Benthic diatoms are cultured usually under laboratory conditions to be used as a food source for other organisms, of aquaculture interest or for biotechnological applications. Laboratory experiments demonstrate the incidence of the physical and chemical variables on abundance and growth rates of diatoms. While macronutrients are usually selected and dosed into common culture mediums to meet the general requirements of a wide range of diatoms, the availability and optimization of micronutrients are more susceptible to each organism's particular physiological conditions.

The aim of this study was to characterize the growth of two species of benthic diatoms isolated from the Salar del Huasco in batch cultures at different conditions of temperature (10, 15 and 20 °C), light intensity (40, 80 and 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and concentrations of silica ($1.06 \times 10^{-4} \text{ M Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ and $2.12 \times 10^{-4} \text{ M Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$) and selenium ($10^{-8} \text{ M H}_2\text{SeO}_3$) in f/2 medium, on a light-dark cycle of 18:6 h.

Both *Nitzschia epithemioides* Grunow in Cleve & Grunow (1880) as *Nitzschia* sp. showed higher maximum cell densities (692800 ± 107704 and 649600 ± 68942 cells ml^{-1} , respectively) and exponential growth rates (1.80 ± 0.56 and 0.97 ± 0.32 div. d^{-1} , respectively) at the highest temperature (20°C). The light intensity to which the cultures were exposed had no effect on cell density and exponential growth rate in both taxa. Regarding to nutrients, an increase in silicates concentrations on the culture medium could promote the growth of *N. epithemioides* and *Nitzschia* sp, since a tendency was observed to higher cell densities ($1.08 \times 10^6 \pm 84.639$ and $1.32 \times 10^6 \pm 109.038$ cells ml^{-1} , respectively) and exponential growth rates ($1.98 \pm 0,44$ and $0.95 \pm 0,18$ div. d^{-1} , respectively) with respect at the normal f/2 medium and f/2 medium plus selenium. Simultaneous addition of silicate and selenium to the culture

medium increased the maximum cell density of the two strains under study, but this increase was significant ($p = 0.05$) only for *N. epithemioides* and among the normal f/2 medium (719200 ± 116895 cells ml^{-1}) and the f/2 medium with double the amount of silicate and selenium (1498800 ± 209599 cells ml^{-1}). However, the exponential growth rates were not significantly different when compared to those of the control (without the addition of silicate and selenium).

In conclusion both *N. epithemioides* and *Nitzschia* sp shown an increased cell density and exponential growth rate at 20 °C. The different light intensities not significantly influenced the growth of both taxa. An increase in the concentration of silicates or simultaneous increase in silicates and selenium in the culture medium can be considered as possible strategy to increase cell density of benthic diatom *N. epithemioides* in batch cultures.

KEYWORDS: Growth characteristics, culture, *Nitzschia*, selenium, silicate.

RESUMEN

Las diatomeas bentónicas usualmente son cultivadas bajo condiciones de laboratorio para ser utilizadas como fuente de alimento de otros organismos de interés acuícola o para aplicaciones biotecnológicas. Experimentos de laboratorio demuestran la incidencia de las variables físicas y químicas sobre la abundancia y tasas de crecimiento de las diatomeas. Mientras los macronutrientes están generalmente seleccionados y dosificados en los medios de cultivo más comunes para satisfacer los requerimientos generales de un amplio rango de diatomeas, la disponibilidad y optimización de micronutrientes son más susceptibles a las condiciones fisiológicas particulares de cada organismo.

El objetivo de este estudio fue caracterizar el crecimiento de dos especies de diatomeas bentónicas aisladas del Salar del Huasco en cultivos tipo batch, a diferentes condiciones de temperatura (10, 15 y 20 °C), intensidad de la luz (40, 80 y 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), y concentraciones de sílice (1.06×10^{-4} M $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ y 2.12×10^{-4} M $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$) y selenio (10^{-8} M H_2SeO_3) en medio f/2, a un ciclo 18:6 h luz-oscuridad.

Tanto *Nitzschia epithemioides* Grunow in Cleve & Grunow (1880) como *Nitzschia* sp, exhibieron las mayores densidades celulares máximas (692800 ± 107704 y 649600 ± 68942 células mL^{-1} , respectivamente) y tasas de crecimiento exponencial (1.80 ± 0.56 y 0.97 ± 0.32 div. d^{-1} , respectivamente) a la temperatura más elevada (20 °C). La intensidad de luz a la cual los cultivos fueron expuestos no afectó la densidad celular y tasa de crecimiento exponencial en ambos taxa. En cuanto a los nutrientes, un incremento en la concentración de silicatos en el medio de cultivo, podría favorecer el crecimiento de *N. epithemioides* y *Nitzschia* sp, ya que, se observó una tendencia al aumento en la densidad celular ($1.08 \times 10^6 \pm 84.639$ y $1.32 \times 10^6 \pm 109.038$ células mL^{-1} , respectivamente) y tasa de crecimiento exponencial (1.98 ± 0.44 y 0.95 ± 0.18 div. d^{-1} , respectivamente) con respecto a los medios f/2 normal y f/2 más selenio. La adición simultanea de silicato y selenio al medio de cultivo, aumentó las densidades celulares máximas de las dos cepas bajo estudio, pero este aumento fue significativo ($p = 0.05$) sólo para *N. epithemioides* y entre los medios de cultivo f/2 normal (719200 ± 116895 células mL^{-1}) y medio f/2 con el doble de silicato y selenio (1498800 ± 209599 células mL^{-1}). Sin embargo, las tasas de

crecimiento exponencial no tuvieron diferencias significativas con el control (sin adición de silicato y selenio).

En conclusión tanto *N. epithemioides* y *Nitzschia* sp muestran un aumento en la densidad celular y la tasa de crecimiento exponencial a 20 °C. Las diferentes intensidades de luz evaluadas no influyeron significativamente en el crecimiento de ambos taxa. Un aumento en la concentración de silicatos o aumento simultáneo de silicatos y selenio en el medio de cultivo puede ser considerado como posible estrategia para incrementar la densidad celular de la diatomea bentónica *N. epithemioides* en cultivos discontinuos.

PALABRAS CLAVE: Características de crecimiento, cultivo, *Nitzschia*, selenio, silicato.

INTRODUCTION

Diatoms are the main microalgal component in biomass and in biodiversity of marine and freshwater aquatic ecosystems, making up a part of phytoplankton and phytobenthos. Their contribution to the global primary production in these ecosystems is highly significant (Round *et al.* 1990). The communities of benthic diatoms, predominantly pennate, are much more difficult to sample and quantify, because they are strongly adhered to different types of substrates and in varied types of environments; for this reason, biologists and ecologists have largely disregarded them and there is little data available in the literature (Raniello *et al.* 2007). Nonetheless, benthic diatoms are cultured usually under laboratory conditions to be used as a food source for other organisms, such as abalone and sea urchin (Dunstan *et al.* 1994) or for biotechnological applications (Stoermer & Smol 1991).

The physiological plasticity of diatoms to environmental factors such as temperature, salinity, light intensity and nutrient concentrations is the keys to their ability to survive and grow in different types of environments (Tomas 1996; Dempster & Sommerfeld 1998; Thessen *et al.* 2005; Affan *et al.* 2007). Numerous laboratory experiments demonstrate the incidence of these factors on abundance and growth rates (Mélédér *et al.* 2003; Mercado *et al.* 2004; Grinten *et al.* 2005; Affan *et al.* 2007; Raniello *et al.* 2007; D'Alelio *et al.* 2009). Particularly important are the concentrations of silicate (macronutrient) and selenium (micronutrient) in the culture medium for the diatoms (Harrison *et al.* 1988; Round *et al.* 1990; Nelson *et al.* 1995; Tréguer *et al.* 1995; Raniello *et al.* 2007). Silicates are essential as a components of the cell wall and as metabolic regulators. In his absence the proteins, DNA, chlorophyll and carotenoid synthesis are inhibited; photosynthesis and glycolysis are reduced; lipid synthesis also can be enhanced and altered by the availability of silicates (Werner 1978; Taguchi *et al.* 1987; Roessler 1988; Round *et al.* 1990). The role of selenium in cell function is still unclear. Some evidence suggests that it is important in cell division processes and maintaining internal membrane integrity (Doucette *et al.* 1987), while it is also an essential part of the enzyme glutathione peroxidase, which protects cells against the destructive effects of hydrogen peroxide (Overbaugh & Fall 1982; Price & Harrison 1988). While macronutrients are usually selected and dosed into common culture mediums to meet the general requirements of a wide range of diatoms, the availability and optimization of micronutrients are more susceptible to each organism's particular physiological conditions (Keller & Selvin 1987).

Diatoms of the Salar del Huasco, in the northern Chilean Altiplano, are subject to severe changes in physical and chemical environmental variables. The limnic systems in this region are characterized by closed endorheic basins with more evaporation than precipitation (Vila & Muhlhauser 1987; Risarcher *et al.* 2003). It has been hypothesized that due to the expansion and contraction of the lakes of the Altiplano, its aquatic organisms have been subjected to drastic changes in both water levels and composition of salts. This has resulted in aquatic systems with physicochemical characteristics that depend heavily on the availability of water (Chong 1988; Keller & Soto 1998; Risarcher *et al.* 2003). It is likely that both the quality and the quantity of the water determine the biological diversity, its distribution and its ability to be present in this type of systems. The information on the systematics and ecology of benthic diatoms in limnic bodies of the Altiplano is scarce and mostly restricted to contributions with a strong physiographic orientation (Márquez-García *et al.* 2009).

The aim of this study was to characterize the growth of two species of benthic diatoms isolated from the Salar del Huasco in batch cultures at different conditions of temperature, light intensity and nutrient concentrations. Considering that the water of Salar del Huasco has high concentration of arsenic (ca. 12 mg L⁻¹), the results of this study, among others, will pursue researches to evaluate the ability of these taxa to bioconcentrate and to biotransform inorganic arsenic in to organic compounds that are less toxic.

MATERIALS AND METHODS

SAMPLE SITE

Water and microalgae samples were collected in summer (November, 2012) from Lagoon Huasco, Salar del Huasco, located in the Altiplano (ca. 4000 m altitude), in the north of Chile (20°17'30"S; 68°52'20"O; Fig. 1). Its maximum depth is 40 cm and has unique physiographic and climatic characteristics (Risacher *et al.* 2003).

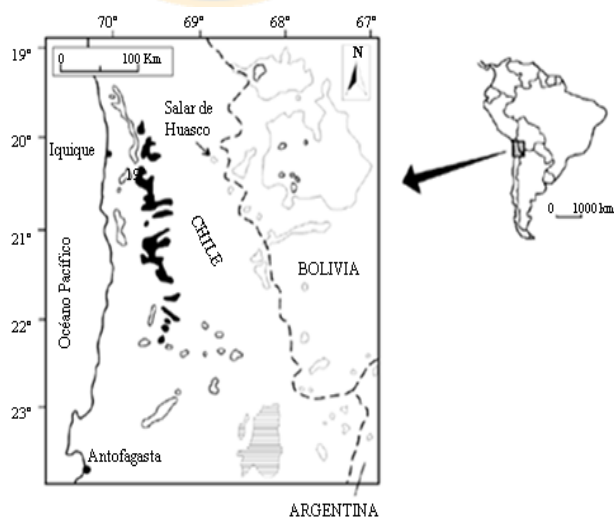


Figure 1. Map of the geographical location of the Salar del Huasco (modified from Chong, 1988).
Figura 1. Mapa de localización geográfica del Salar de Huasco (modificado de Chong, 1988).

PHYSICOCHEMICAL ANALYSES

Water samples were collected in 1 liter polyethylene containers and then after being filtered (0.45 μm), the following parameters were measured: total dissolved solids (TDS), chloride (Cl), sulfate, (SO_4), hardness (CaCO_3), nitrate (NO_3), phosphate (PO_4), sodium (Na) and potassium (K), according to standardized protocols (APHA, AWWA, WPCF 1992). *In situ*, measurements of temperature, electrical conductivity, pH, electrical potential and dissolved oxygen were taken using field equipment, WTW Multiline P3. These data were examined to obtain a reference of environmental conditions for growth of diatoms in terms of salinity, temperature, pH and nutrients.

COLLECTION, ISOLATION AND ESTABLISHMENT OF UNIALGAL CULTURE

Lagoon Huasco, with its high elevation, is subject to strong winds, and because the depth at the collection site was not more than 10 cm, it was possible to obtain, by filtering with 20 μm phytoplankton net, microalgae, mix with floating fine sediment. The retained material was deposited in polyethylene containers and transported, cold, to the laboratory.

To establish unialgal cultures, the isolation method used was single-cell isolation by micropipette and successive washes, according to the protocol described by Andersen Chapter 6 (2005). Basically, the isolation was performed using well slides (with more than one depression) or directly on drops (of culture medium) placed on a slide (in rows) using an inverted microscope (Nikon TS 100). Using sterile Pasteur pipettes, the algal units were isolated and washed one by one, then deposited in test tubes or Petri dishes with f/2 culture medium (Guillard 1975; pH = 8.00, E.C = 52 mS cm^{-1} , TDS = 33300 mg L^{-1}). Finally non-axenic unialgal cultures of the taxa grew in 250 ml Erlenmeyer flasks (ca. 50 ml culture volume), incubated at 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LI-250 Light Meter, LI-COR. U.S.A.), at 20 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ and with a L:D cycle of 18:6 h.

DIATOM IDENTIFICATION

Taxonomic identification was performed based on the distinctive morphological characteristics of each taxon (Cleve-Euler 1953; Hustedt 1930; Krammer & Lange-Bertalot 1988, 1991, 2000, 2004). The morphology and data on cell dimensions of living diatoms were obtained using an Olympus light microscope (model CX 31. Camera, 518CU 5.0M CMOS). To remove the organic matter of the frustules, small volumes of the culture were washed with acid according to the method proposed by Hasle & Fryxell (1970). The frustules were prepared for a scanning electron microscope (SEM) as described by Amato *et al.* (2005) and examined under a scanning electron microscope SEM JEOL JSM6380-LV. The morphology of the frustules were analyzed from photomicrographs taken with a camera (JSM-6830) attached to the SEM microscope.

Strains of benthic diatoms in study were deposited in the Culture Collection of Microalgae, University of Concepción (CCM-UdeC), Chile, under the numbers, CCM-UDEC 296 and CCM-UDEC 297.

EXPERIMENTAL CULTURE CONDITIONS

In order to evaluate growth rate and biomass production of the strains investigated, each taxon was cultured in f/2 + Si medium from Guillard (Guillard 1975). Three culture parameters were tested: temperature (10, 15 and 20 °C), photon flux density (40, 80 and 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and different concentrations of selenium and silicate (Table I). All treatments were maintained on a light-dark cycle of 18:6 h and manual shaking twice a day.

For each strain, 1×10^4 cells ml^{-1} was inoculated into Erlenmeyer flasks containing 100 ml of culture medium and incubated for 20 days. Four replicates were used. The growth was monitored daily by cell counting (2 ml iodine fixed), under a Zeiss inverted microscope, and using Utermöhl chambers of 1 ml capacity. For this purpose, the samples were sonicated during 20 s. The density of cells per ml was calculated with the following formula: For this purpose, the samples were sonicated for 20 s.

$$N^\circ (\text{cells/ml}) = \frac{\text{Total chamber area} \times N^\circ \text{ counted cells.}}{\text{Counted area}}$$

The specific growth rate (k) defined as the increase in cell density per unit time (Guillard 1973) was calculated according to the following equation:

$$k [\text{div./day}] = 3.322 \log (N_1 - N_0) / t_1 - t_0$$

Where N_1 and N_0 correspond to the cell density at the beginning (t_0) and the end (t_1) of the time interval selected between inoculation and maximum cell density, respectively. The average value of the replicates was used for the growth curves of each studied treatment.

Table I. Different concentrations of silicate and selenium in basic f/2 medium.
Tabla I. Diferentes concentraciones de sílice y selenio en medio f/2 básico.

Culture Medium	Silicate	Selenium
f/2	$1.06 \times 10^{-4} \text{ M Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$	-
f/2 double silicates	$2.12 \times 10^{-4} \text{ M Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$	-
f/2 selenium	$1.06 \times 10^{-4} \text{ M Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$	$10^{-8} \text{ M H}_2\text{SeO}_3$
f/2 double silicates and selenium	$2.12 \times 10^{-4} \text{ M Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$	$10^{-8} \text{ M H}_2\text{SeO}_3$

STATISTICAL ANALYSES

To determine significant differences between exponential growth rates and cell densities in the different treatments (temperature, photon flux density, and different concentrations of silicate and selenium in f/2 medium), comparisons were carried out using one-way analysis variance (ANOVA), followed by multiple comparisons with a Tukey's test. A value of $p < 0.05$ was considered significant. All of the statistical analysis was performed using the software SigmaPlot, version 11.0 (Systat Software Inc.).

RESULTS

PHYSICOCHEMICAL ANALYSIS

The *in situ* measurements of temperature, electrical conductivity, pH, electrical potential, dissolved oxygen and the chemical analysis of the water (Table II), determined that the water was alkaline, saline and its major ions corresponded to sodium, chlorides and sulfates.

Table II. Physical and chemical parameters of water from Lagoon Huasco.
Tabla II. Parámetros físicos y químicos del agua de Laguna Huasco.

<i>in situ</i>		Chemical (mg L ⁻¹)	Analysis
Temperature	12.5 °C	TDS	50821
Electrical Conductivity	64 mS/cm	Cl	13028
pH	8.65	SO ₄	4389
Electric Potential	-93 mV	CaCO ₃	3109
Dissolved Oxygen	4.57 mg L ⁻¹	NO ₃	9.32
		PO ₄	3.83
		Na	8140
		K	4017
		As	12.5 ± 0.8

*Data analyzed in water samples taken at the collection site of microalgae.

*Datos analizados en las muestras de agua tomadas en el sitio de colección de las microalgas.

DIATOMS IDENTIFICATION

Light microscope (LM) observations for both taxa revealed single cells with an isopolar frustule and bilateral symmetry, with oval, elongated valves, rounded at the polar endings. Generally two chloroplasts per cell were observed (Fig. 2 A, B and F).

Under scanning electron microscope (SEM), it was possible to identify only one taxon at species level. This was *Nitzschia epithemioies* Grunow in Cleve & Grunow (1880). Its valves were depressed or constrained in the central region (Fig. 2 A - C); cell length $22.97 \pm 3.41 \mu\text{m}$ and width $6.93 \pm 1.08 \mu\text{m}$; showed fibulae of two types (1) small isodiametrical structures, 9 to 12 in $10 \mu\text{m}$ (Fig. 2 E), and (2) transversely elongated ribs, some of which pass completely through the valve, 3 to 5 in $10 \mu\text{m}$ (Fig. 2 D, E). There is a central pair of fibulae farther apart than the others (Fig. 2 E); central raphe endings presented a tiny pimple-like thickening of the margin (Fig. 2 D).

The other taxon identified at genus level corresponded also to the genus *Nitzschia* (Fig. 2 F - J), cells were smaller than *N. Epithemioies* : length $12.61 \pm 2.54 \mu\text{m}$ and width $6.06 \pm 0.97 \mu\text{m}$; raphe system fibulate, usually along the border of the valve, with fibulae that are small and discrete, square or rectangular (Fig. 2 H - J).

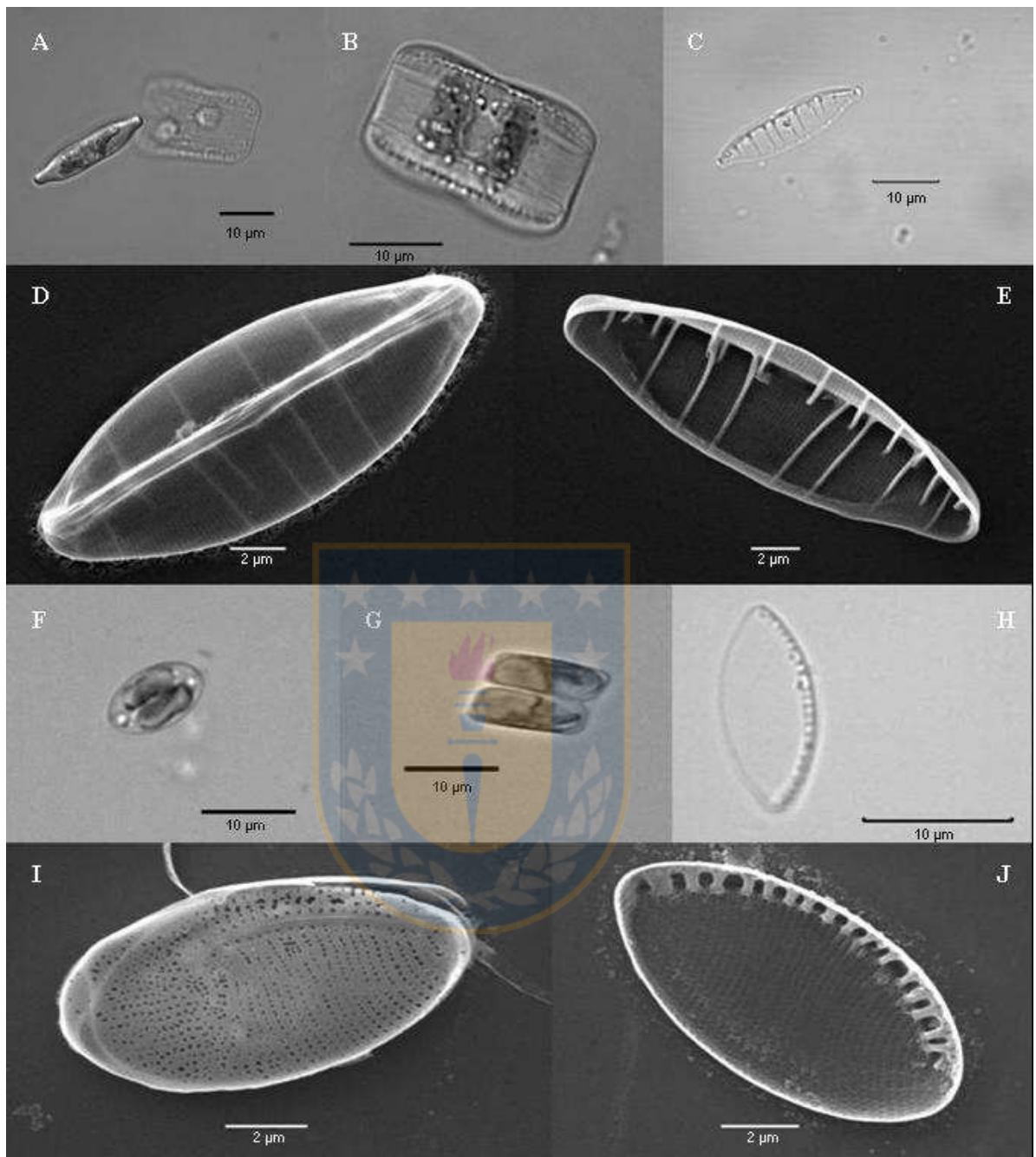


Figure 2. Cell morphology *Nitzschia epithemioides* (CCM-UDEC 196). live cells observed in light microscope (LM), singular view (A), dorsal view (B); Oxidized frustule observed in LM (C); Frustule ultrastructure observed in scanning electron microscope (SEM), external view of Sternum valve (SV) (D), internal view of SV (E). Cell morphology of *Nitzschia* sp (CCM-UDEC 297). live cells observed in LM, dorsal view (F), ventral view (G); Oxidized frustule observed in LM (H); Frustule ultrastructure observed in SEM, external view of SV (I), internal view of SV (J).

Figura 2. Morfología celular *Nitzschia epithemioides* (CCM-UDEC 296). células vivas observadas en microscopia fotonica (LM), vista singular (A), vista dorsal (B); Frustulo oxidado observado en LM (C);

Ultraestructura del frustulo observada en microscopia electronica de barrido (SEM), vista externa del esqueleto valvar (SV) (D), vista interna del SV (E). Morfologia celular *Nitzschia* sp (CCM-UDEC 297). células vivas observadas en LM, vista dorsal (F), vista ventral (G); Frustulo oxidado observado en LM (H); Ultraestructura del frustulo observada en SEM, vista externa del SV (I), vista interna del SV (J).

GROWTH CURVES AT DIFFERENT TEMPERATURES

For *Nitzschia epithemioides*, the carrying capacity of the cultures was reached at 18 days of incubation at 10 and 15 °C, and at 16 days at 20 °C (Fig. 3 A). Significant differences ($p \leq 0.05$) were found in cell density for the three temperatures tested. The higher maximum cell density was observed at 20 °C (692800 ± 107704 cells ml^{-1}), followed by 15 °C (337200 ± 64351 cells ml^{-1}) and 10 °C (85008 ± 11115 cells ml^{-1}), respectively. All of the pairwise multiple comparison procedures based on the Tukey Test were significant ($p = 0.05$) for the cultures incubated at 20 and 10 °C and the cultures incubated at 20 and 15 °C. The exponential growth rate (k) was not significantly different among the three temperatures. However, the reported value at 20 °C was approximately double (1.80 ± 0.56 div. d^{-1}), to that reported at 15 and 10 °C (1.09 ± 0.30 and 0.97 ± 0.36 div. d^{-1} , respectively).

For *Nitzschia* sp, the carrying capacity of the cultures was reached at 18 days of incubation of the evaluated temperatures (Fig. 3 B). Significant differences ($p \leq 0.05$) were found in cell density among the three temperatures. The higher maximum cell density was observed at 20 °C (649600 ± 68942 cells ml^{-1}), followed by 15 °C (361900 ± 93734 cells ml^{-1}) and 10 °C (247720 ± 46471 cells ml^{-1}). All of the pairwise multiple comparison procedures based on the Tukey Test were significant ($p = 0.05$) among the incubated cultures at 10 and 20 °C. The exponential growth rate (k) was not significantly different among the temperatures evaluated (0.97 ± 0.32 , 0.59 ± 0.29 and 0.47 ± 0.07 div. d^{-1} at 20, 15 and 10 °C).

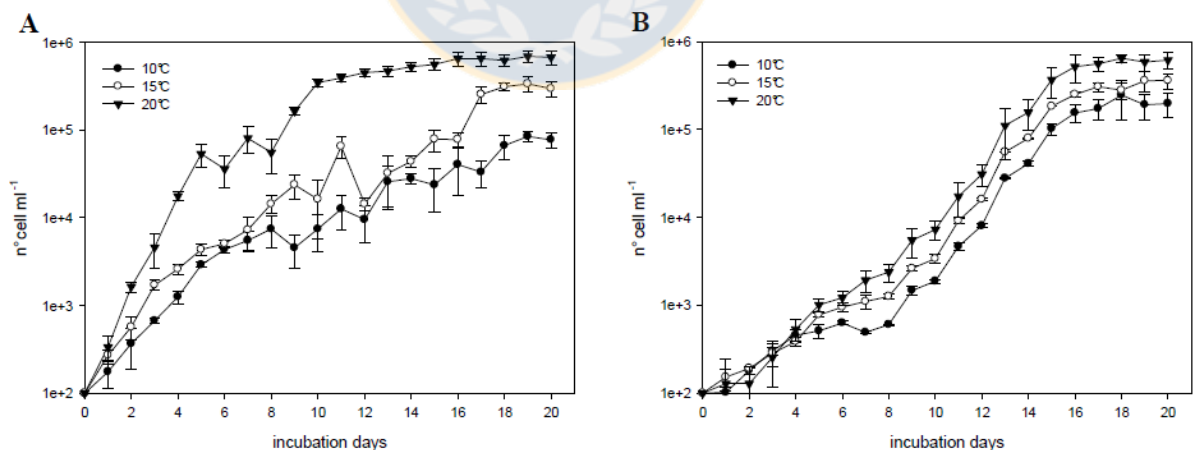


Figure 3. Growth curves for *Nitzschia epithemioides* (A) and *Nitzschia* sp (B) derived at different temperatures and incubated in f/2 medium at $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, with a 18:6 h light-dark cycle. Figure 3. Curvas de crecimiento para *Nitzschia epithemioides* (A) y *Nitzschia* sp (B) derivadas a diferentes temperaturas e incubadas en medio f/2 a $120 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con un ciclo 18:6 h luz-oscuridad.

GROWTH CURVES AT DIFFERENT LIGHT INTENSITIES

Growth curves for *Nitzschia epithemioides* at 40, 80 and 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ can be seen in Fig. 4 A. The carrying capacity of the cultures was reached at 16 days of incubation at all photon flux densities evaluated. Although, no significant differences ($p \leq 0.05$) were found at 40, 80 y 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, both in maximum cell density (791200 ± 76114 , 692800 ± 107704 and 719200 ± 116895 cells ml^{-1} , respectively) and exponential growth rate (1.73 ± 0.38 , 1.80 ± 0.56 and 1.38 ± 0.72 div. d^{-1} , respectively), a tendency is observed at higher cell densities and growth rates of microalgae at lower irradiances.

For *Nitzschia* sp, the growth curves can be observed in Fig. 4 B. The carrying capacity of the cultures was reached at 18 days of incubation for all photon flux densities evaluated. No significant differences ($p \leq 0.05$) were found in maximum cell density among 40, 80 and 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (667200 ± 38467 , 643800 ± 128640 , 709440 ± 128200 cells ml^{-1} , respectively). The exponential growth rate (k) neither showed significant differences (0.77 ± 0.60 , 0.87 ± 0.38 y 0.96 ± 0.39 div. d^{-1} , respectively). However, its value tended to increase in the higher irradiances.

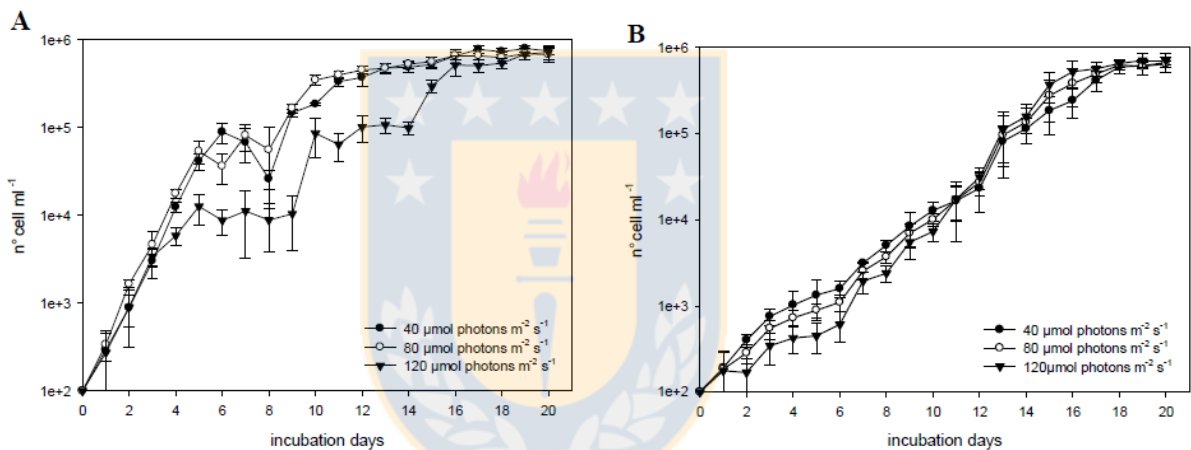


Figure 4. Growth curves for *Nitzschia epithemioides* (A) and *Nitzschia* sp (B) derived at different light intensities and incubated in f/2 medium at 20°C, with a 18:6 h light-dark cycle.

Figura 4. Curvas de crecimiento para *Nitzschia epithemioides* (A) y *Nitzschia* sp (B) derivadas a diferentes intensidades de luz e incubadas en medio f/2 a 20°C, con un ciclo 18:6 h luz-oscuridad.

EFFECTS OF THE CHANGES IN THE CONCENTRATION OF SILICA AND SELENIUM

For the experiments at different concentrations of silicate and selenium, was selected the higher temperature (20 °C) and photon flux density (120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), since, in these conditions both taxa showed high cell densities.

For *Nitzschia epithemioides* the carrying capacity of the culture was reached within 16 days of incubation in normal f/2 medium and within 11 days in the f/2 medium with double silicate, f/2 medium with selenium, and f/2 medium with double silicate and selenium (Fig. 5 A). No significant differences were found in maximum cell density among normal f/2 medium (719200 ± 116895 cells ml^{-1}), f/2 medium with double silicate (1085600 ± 84639 cells ml^{-1}), f/2 medium with selenium (1133200 ± 142255 cells ml^{-1}) and f/2 medium with double silicate and selenium (1498800 ± 209599 cells ml^{-1}). Nevertheless, the multiple comparison procedures from the Tukey Test were significant ($p = 0.05$) among the f/2 medium

with a double concentration of silicate and selenium and the normal f/2 medium. The exponential growth rate (k) was not significantly different among the four treatments (1.38 ± 0.31 , 1.98 ± 0.44 , 1.48 ± 0.54 and 1.77 ± 0.45 div d^{-1} , respectively).

For *Nitzschia* sp., the carrying capacity of the culture was reached within 18 days of incubation for all concentrations of silicate and selenium evaluated (Fig. 5 B). No significant differences were found for maximum cell density among normal f/2 medium (7094400 ± 128640 cells ml^{-1}), f/2 medium with double silicate (1320400 ± 109038 cells ml^{-1}), f/2 medium with selenium (947520 ± 224525 cells ml^{-1}) and f/2 medium with twice the concentration of silicate and selenium (1401120 ± 296267 cells ml^{-1}), but it was observed that cells increased about twice in the medium with the highest nutrients concentration and normal f/2 medium. The exponential growth rate (k) showed no significant difference among the four treatments (0.91 ± 0.38 , 0.95 ± 0.18 , 0.72 ± 0.35 and 0.95 ± 0.31 div. d^{-1} , respectively).

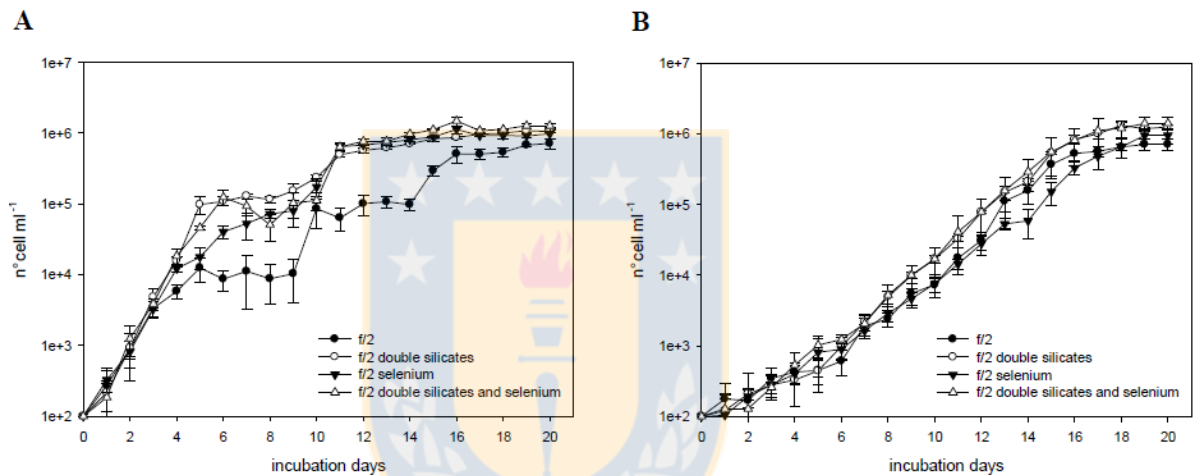


Figure 5. Growth curves for *Nitzschia epithemioides* (A) and *Nitzschia* sp (B) cultures incubated in f/2 medium with different Na_2SiO_3 and H_2SeO_3 concentrations at $20^\circ C$ and $120 \mu mol$ photons $m^{-2} s^{-1}$, with a 18:6 h light-dark cycle.

Figura 5. Curvas de crecimiento para *Nitzschia epithemioides* (A) y *Nitzschia* sp (B) cultivos incubados en medio f/2 con diferentes concentraciones de Na_2SiO_3 y H_2SeO_3 a $20^\circ C$ y $120 \mu mol$ de fotones $m^{-2} s^{-1}$, con un ciclo 18:6 h luz-oscuridad.

DISCUSSION

The existing literature on the ecology, taxonomy and cultivation of microalgae of high saline ecosystems in Chile and South America is very scarce. Studies conducted in aquatic systems of the Chilean Altiplano highlight diatoms as the most important algal group in terms of abundance, since they are more tolerant to the high salinities of these systems and, therefore, being the base of the food chain, especially as diet for waterfowl (i.e. flamingos) (Vargas *et al.* 2004; Márquez-García *et al.* 2009). Diatom studies conducted in Andean bodies of water in Chile are scarce (Mühlhauser *et al.* 1995; Cruces *et al.* 2006; Rivera & Cruces 2008, 2009), due to the difficulty of sampling, the variety of morphological and hydrological characteristics, complexity of the geological patterns of their water bodies, and the wide

range of chemical and biological features for these environments. The diatom taxa investigated in these studies are generally epipelagic, but some are really planktonic and periphytic. They are found in freshwater, brackish water and marine habitats. *Nitzschia epithemioides*, one of the species found in lagoon Huasco is a brackish water species, found in muddy habitats (saline lakes and coastal areas), and has a wide geographic distribution. It has been reported in Europe [Romania (Caraus 2002, 2012), Great Britain (Whitton *et al.* 2003), Germany (Scholz & Liebezeit 2012), Spain (Álvarez Cobelas & Estévez García 1982, Aboal, Marín & Zafra 2003)], Asia [China (Liu 2008), Taiwan (Shao 2003-2014)], North America [New Brunswick (Thaler & Kaczmarek 2009)] and South America [Salar de Uyuni (3650 m), Altiplano, Bolivia (Rumrich *et al.* 2000, Alvial *et al.* 2008), Jujuy, Argentina (Maidana *et al.* 2009)].

The temperature in Andean ecosystems, shows strong daily fluctuations and low average temperature of the water, particularly Lagoon Huasco which exhibited an average temperature of 5 °C (Risachert *et al.* 2003), *in situ* water temperature was 12.5 °C (November, summer 2012). Therefore, for laboratory cultures was evaluated as lower temperature, 10 °C, and to increased cell densities and growth rates 15 and 20 °C. Both taxa (*N. epithelioid* and *Nitzschia* sp) exhibited growth rates and cell densities higher at the highest tested temperature (20 °C). These results are consistent with the trend found by other researchers in other benthic diatoms under culture conditions. Admiral (1977) conducted unialgal cultures of estuarine benthic diatoms, *Amphiprora* c. f. *paludosa*, *Nitzschia* c. f. *dissipata*, *Navicula arenaria* and *Nitzschia sigma* at different temperatures, obtaining a higher growth rate from 16 to 20 °C for *N. arenaria*, the other three species obtained high growth rates at 25 °C or above this value. Grinten *et al.* (2005) studied the growth of the diatom *Nitzschia perminuta* at different temperatures (7, 15 and 20 °C), finding the highest maximum growth rate at 25 °C (0.65 ± 0.14 div. d⁻¹), followed by 15 °C (0.30 ± 0.10 div. d⁻¹) and 7 °C (0.26 ± 0.03 div. d⁻¹). Scholz & Liebezeit (2012) evaluated the effect of different temperatures in the cultures of 25 species of marine benthic diatoms. Most species isolated reached maximum growth rates at higher temperatures (10 to 35 °C), with a low growth significant and decrease in cell density at temperatures ≥ 30 °C and ≤ 4 °C.

The results reported in this study suggest a good tolerance capacity of diatoms for a range of light among 40 and 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, since, cell density and exponential growth rate were not affected by light intensity to which the cultures were exposed. Although there were no significant differences ($p \leq 0.05$) in the exponential growth rate among irradiances evaluated, *N. ephitemioides* presented a trend to higher growth rates at the lower photon flux densities (1.73 ± 0.38 and 1.80 ± 0.56 div. d⁻¹, at 40 and 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively). Instead, *Nitzschia* sp exhibited the highest growth rate at 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; (0.96 ± 0.39 div. d⁻¹). Grinten *et al.* (2005) reported results with a similar tendency to those found for *N. ephitemioides* in the diatom *Nitzschia perminuta* that presented a low increase in cell density at the higher light intensity (200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), compared to the lower light intensities (40 and 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and a highest maximum growth rate at 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (0.39 ± 0.04 d⁻¹) than at 5 and 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (0.28 ± 0.03 and 0.29 ± 0.02 d⁻¹, respectively). These differences in growth could be attributable to that benthic diatoms are efficient in the use of low irradiances for inorganic assimilation (Rivkin & Putt 1987). On the other hand, Correa-Reyes *et al.* (2001), isolated several strains of benthic diatoms of the *Nitzschia* gender in batch cultures under different light

conditions and suggest that some strains of benthic diatoms could be cultured under high light irradiance without photoinhibition, which could explain the behavior that we reported in this study for *Nitzschia* sp. The available scientific information suggests that the saturation light intensity may vary among benthic diatoms species, several authors have speculated about an inherently greater resistance to irradiance stress of microphytobenthic algae. Diatoms intertidal microphytobenthos often are exposed to high radiation, disrupting the ability of the cells to balance the fluctuating supply of light energy with the demands of cellular metabolism and growth, thus exposing the photosynthetic machinery to the risks of over-excitation and oxidative damage. It is therefore likely that benthic microalgal species possess several mechanical and physiological adaptations that enable survival in a highly variable environment (Blanchard & Montagna 1992; Peletier *et al.* 1996; Kromkamp *et al.* 1998; Barranguet *et al.* 1998).

Silicon is an essential element for diatoms, both as structural material and as metabolic regulators, affecting a wide range of cellular processes. Our results suggest that an increase in silicates concentrations on the culture medium could promote the growth of *N. epithemioides* and *Nitzschia* sp, since a tendency was observed to higher cell densities ($1.08 \times 10^6 \pm 84.639$ and $1.32 \times 10^6 \pm 109.038$ cells ml⁻¹, respectively) and exponential growth rates ($1.98 \pm 0,44$ and $0.95 \pm 0,18$ div. d⁻¹, respectively) with respect at the normal f/2 medium and f/2 medium plus selenium. Raniello *et al.* (2007) conducted experiments to evaluate the effect of different silicate and selenium concentrations on diatom *Cocconeis neothumensis*, reporting that one of the highest exponential growth rates was observed in f/2 medium with double the amount of silicate (0.85 ± 0.11 day⁻¹). These experimental conditions also provided the highest cell density at saturation (ca. 2,700 cells mm⁻²).

The results on the effect of selenium in cultures of *N. Epithemioides* and *Nitzschia* sp were not significant, but these suggest an increase in the maximum cell density (1133200 ± 142255 and 947520 ± 224525 cells ml⁻¹, respectively) compared to the maximum cell density observed in cultures using normal f/2 medium (ca. 720,000 cells ml⁻¹ for both strains). However, exponential growth rates of both strains did not show a positive increase relative to other nutrient concentrations evaluated. This could be attributed to that despite the importance of selenium for normal development and growth of diatoms, intraspecific and interspecific differences exist for the requirement of selenium in microalgae. Doblin *et al.* (1999) reported that there was no change in growth or biomass yields in *Chaetoceros* cf. *tenuissimus* cultures after approximately 60 generations, indicating that this diatom species has no selenium requirement, or that its selenium requirement was met by the background selenium levels in the culture medium. This adds to the findings of Harrison *et al.* (1988) who demonstrated the variable Se requirement within the *Chaetoceros* genus.

As for the simultaneous addition of silicate and selenium to the culture medium. We observed an increase in the maximum cell density for the two strains under study, although this was only significant (Tukey test) for *N. epithemioides* and among the normal f/2 medium (719200 ± 116895 cells ml⁻¹) and the f/2 medium with double the amount of silicate and selenium (1498800 ± 209599 cells ml⁻¹). The exponential growth rates were not significantly different in any treatment in both strains. Raniello *et al.* (2007) report different results for benthic diatom *Cocconeis neothumensis* indicating that a simultaneous

increase of silicate concentration and the presence of selenium in the culture medium results in a loss of the positive effects detected with single nutrient. They argued that a higher SiO_3^{2-} amount in the culture medium, lead to a decreased uptake of SeO_3^{2-} by *C. neothumensis* cells and viceversa. Or occurring a negative interaction between selenium and silicates inside the cell, in the context of diatom physiology, although very limited data has been reported in the literature regarding the metabolic interference between selenium and silicates (Müller *et al.* 2005). These differences with our results could be attributed to that diatoms have different physiological and metabolic behavior, and to that culture conditions tested by Raniello were not the same of the present study.

In conclusion both *N. epithemioides* and *Nitzschia* sp shown an increased cell density and exponential growth rate at 20 °C. The different light intensities not significantly influenced the growth of both taxa. An increase in the concentration of silicates or simultaneous increase in silicates and selenium in the culture medium can be considered as possible strategy to improve cell density of benthic diatom *N. epithemioides* in batch cultures.

Acknowledgments

We thank Dr. Patricio Rivera (Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Chile) for their help in the taxonomical identification of the diatom species. Thanks also to the group of microalgal research FICOLAB. This work was funded by Fondecyt N° 1120807 and project “CRHIAM /CONICYT/FONDAP/15130015”

REFERENCES

Aboal, M., J.P. Marín & E. Zafra. 2003. *Control de la calidad biológica de los ríos de Euskadi mediante el uso de microalgas. Campaña de verano 2002. Informe final.* ANBIOTEK S.L. In: Guiry M.D. & Guiry G.M. 2014. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 16 December 2014.

Admiraal, W. 1977. Influence of light and temperature on the growth rate of estuarine benthic diatoms in culture. *Marine Biology* 39: 1–9.

Affan, A., R. Karawita, Y.J. Jeon & J.B. Lee. 2007. Growth characteristics and antioxidant properties of the benthic diatom *Navicula incerta* (Bacillariophyceae) from Jeju Island, Korea. *Journal of Phycology* 43: 823–832.

Álvarez-Cobelas, M. & A. Estévez-García. 1982. Catálogo de las algas continentales españolas. I. *Diatomophyceae* Rabenhorst 1864. *Lazaroa* 4: 269-285. In: Guiry M.D. & Guiry G.M. 2014. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 16 December 2014.

Alvial, I. E., F. J. Cruces, A. E. Araneda, M. Grosjean & R. E. Urrutia. 2008. Estructura comunitaria de diatomeas presentes en los sedimentos superficiales de ocho lagos andinos de Chile central. *Revista Chilena de Historia Natural* 81: 83-94.

Amato, A., L. Orsini, D. D'Alelio & M. Montresor. 2005. Life cycle, size reduction patterns, and ultrastructure of the pennate planktonic diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 41: 542-556.

Andersen, R.A. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Phycological Society of America, Elsevier Academic Press. Ed. Andersen R.A., Amsterdam. 578 pp.

APHA, AWWA, WPCF. 1992. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Preparado y publicado conjuntamente por: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. Ed. Diaz de Santos S.A., Madrid, España. 1470 pp.

Barranguet, C., J. Kromkamp & J. Peene. 1998. Factors controlling primary production and photosynthetic characteristics of intertidal microphytobenthos. *Marine Ecology Progress Series* 173: 117-126.

Blanchard, G.F. & P.A. Montagna. 1992. Photosynthetic response of natural assemblages of marine benthic microalgae to short- and long-term variations of incident irradiance in Baffin Bay, Texas. *Journal of Phycology* 28: 7-14.

Caraus, I. 2002. The algae of Romania. *Studii si Cercetari, Universitatea Bacau, Biologie* 7: 1-694. In: Guiry M.D. & Guiry G.M. 2014. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 16 December 2014.

Caraus, I. 2012. *Algae of Romania. A distributional checklist of actual algae*. Version 2.3 third revision. Bacau: *Universitatea Bacau*. In: Guiry M.D. & Guiry G.M. 2014. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 16 December 2014.

Correa-Reyes, J.G., M. Del Pilar Sanchez-Saavedra, D.A. Siqueiros-Beltrones & N. Flores-Acevedo. 2001. Isolation and growth of eight strains of benthic diatoms, cultured under two light conditions. *Journal of shellfish research* 20: 603-610.

Chong, G.D. 1988. The Cenozoic saline deposits of the Chilean Andes between 18°00' and 27°00' south latitude. In: H. Bahlburg, C. Breitreuz & P. Geise (eds.), *The Southern Andes*, vol. 17, pp. 137-151. *Lecture Notes in Earth System Sciences*.

- Cleve-Euler, A. 1953. Die Diatomeen von Schweden und Finnland. Part II, Arraphideae, Brachyraphideae. *Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar* ser. 4, 3/5: 1-255 pp.
- Cruces, F., R. Urrutia, O. Parra, A. Araneda, H. Treutler, S. Bertrand, N. Fagel, L. Torres, R. Barra & L. Chirinos. 2006. Changes in diatom assemblages in an Andean lake in response to a recent volcanic event. *Archiv für Hydrobiologie* 165: 23-35.
- D'alelio, D., A. Amato, A. Luedeking & M. Montresor. 2009. Sexual and vegetative phases in the planktonic diatom *Pseudo-nitzschia multistriata*. *Harmful Algae* 8: 225-232.
- Dempster, T.D. & M.R. Sommerfeld. 1998. Effects of environmental conditions on growth and lipid accumulation in *Nitzschia communis* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 34: 712–21.
- Doblin, M.A., S.I. Blackburn & G.M. Hallegraeff. 1999. Comparative study of selenium requirements of three phytoplankton species: *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium minutum* (Dinophyta) and *Chaetoceros* cf. *tenuissimus* (Bacillariophyta). *Journal of Plankton Research* 21: 1153-1169.
- Doucette, G.J., N.M. Price & P.J. Harrison. 1987. Effects of selenium deficiency on the morphology and ultrastructure of the coastal marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 23: 9–17.
- Dunstang, G.A., J.K. Volkman, S.M. Barret, J.M. Leroy & S.W. Jeffrey. 1994. Essential polyunsaturated fatty acid from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). *Photochemistry* 35: 155-161.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feed marine invertebrates. In: W.L. Smith & M. H. Chanley (eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*, pp. 29-60. Plenum Press, New York.
- Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. In: J.R. Stein (eds.), *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*, pp. 289-312. Cambridge University Press, Cambridge.
- Griten, E., A. Janssen, K. Mutsert, C. Barranguet & W. Admiraal. 2005. Temperature-and light-dependent performance of the cyanobacterium *Leptolyngbya foveolarum* and the diatom *Nitzschia perminuta* in mixed biofilms. *Hydrobiologia* 548: 267-278.
- Harrison, P.J., P.W. Yu, P.A. Thompson, N.M. Price & D.J. Phillips. 1988. Survey of selenium requirements in marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 47: 89-96.
- Hasle, G.R. & G.A. Fryxell. 1970. Diatoms: cleaning and mounting for light and electron microscopy. *Transactions of the American Microscopical Society* 89: 469–74.

- Hustedt, F. 1930. Bacillariophyta (Diatomae). In: A. Pascher (eds.), Die Süßwasser-flora Mitteleuropas, vol. 10, pp. 466. Gustav Fischer, Jena.
- Keller, M.D. & R.C. Selvin. 1987. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *Journal of Phycology* 23: 633-638.
- Keller, B. & D. Soto. 1998. Hydrogeologic influences on the preservation of *Orestias ascotanensis* (Teleostei: Cyprinodontidae), in Salar de Ascotán, northern Chile. *Revista Chilena Historia Natural* 71: 147-156.
- Krammer, K. & H. Lange-Bertalot. 1988. Bacillariophyceae 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. In: H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa. G. Fischer, Jena.
- Krammer, K. & H. Lange-Bertalot. 1991. Bacillariophyceae 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. In: H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa, 437 pp. Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Krammer, K. & H. Lange-Bertalot. 2000. Bacillariophyceae 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. In: H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa, 598 pp. Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Krammer, K. & H. Lange-Bertalot. 2004. Bacillariophyceae 4. Teil: Achnanthaceae Kritische Ergänzungen zu *Navicula* (Lineolatae) und *Gomphonema*. In: H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa, G. Fischer, Jena.
- Kromkamp, J., C. Barranguet & J. Peene. 1998. Determination of microphytobenthos PSII quantum efficiency and photosynthetic activity by means of variable chlorophyll fluorescence. *Marine Ecology Progress Series* 162: 45–55.
- Liu, R. 2008. Checklist of biota of Chinese seas. Beijing: Science Press, Academia Sinica. 1267 pp. In: Guiry M.D. & Guiry G.M. 2014. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 16 December 2014.
- Maidana, N.I, C. Seeligmann & M. Morales. 2009. Bacillariophyceae del complejo lagunas Vilama (Jujuy, Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 44(3-4): 257-271.
- Márquez-García, M., I. Vila, L.F. Hinojosa, M.A. Méndez, J.L. Carvajal & M.C. Sabando. 2009. Distribution and seasonal fluctuations in the aquatic biodiversity of the southern Altiplano. *Limnologica* 39: 314-318.

- Meleder, V., L. Barille, P. Launeau, V. Carrere & Y. Rince. 2003. Spectrometric constraint in analysis of benthic diatom biomass using monospecific cultures. *Remote Sensing of Environment* 88: 386-400.
- Mercado, J.M., M.P. Sánchez-Saavedra, G. Correa-Reyes, L. Lubián, O. Montero & F.L. Figueroa. 2004. Blue light effect on growth, light absorption characteristics and photosynthesis of five benthic diatom strains. *Aquatic Botany* 78: 265-277.
- Mühlhauser, H., N. Hrepic, P. Mladinic, V. Montecino & S. Cabrera. 1995. Water quality and limnological features of a high altitude Andean lake, Chungará in northern Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 68: 341-349.
- Müller, W.E.G., A. Borejko, D. Brandt, R. Osinga, H. Ushijima, B. Hamer, A. Krasko, C. Xupeng, I.M. Müller & H.C. Schröder. 2005. Selenium affects biosilica formation in the demosponge *Suberites domuncula*. *Federation of European Biochemical Societies* 272: 3838-3852.
- Nelson, D.M., P. Tréguer, M.A. Brzezinski & A. Leynaert. 1995. Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochemical Cycles* 9: 359-72.
- Overbaugh, J.M. & R. Fall. 1982. Detection of glutathione peroxidases in some microalgae. *FEMS Microbiology Letters* 13: 371-375.
- Peletier, H., W.W.C. Gieskes & A.G.J. Buma. 1996. Ultraviolet-B radiation resistance of benthic diatoms isolated from tidal flats in the Dutch Wadden Sea. *Marine Ecology Progress Series* 135: 163-168.
- Price, N.M. & P.J. Harrison. 1988. Specific selenium-containing macromolecules in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Plant Physiology* 86: 192-199.
- Raniello, R., M.M. Iannicelli, M. Napo, C. Avila & V. Zupo. 2007. Production of *Cocconeis neothumensis* (Bacillariophyceae) biomass in batch cultures and bioreactors for biotechnological applications: light and nutrient requirements. *Journal of Applied Physiology* 19: 383-391.
- Risarcher, F., H. Alonso & C. Salazar. 2003. The origin of brines and salts in salars: a hydrogeochemical review. *Earth Science Reviews* 63: 249-293.
- Rivera, P. & F. Cruces. 2008. *Fragilaria capuchina* desm. var. *mesogongyla* Frenguelli, una diatomea presente en la zona norte de la Cordillera de los Andes (Chile), con comentarios sobre la variabilidad del número de procesos labiados en algunos géneros arafidales. *Gayana Botánica* 65(2): 131-138.

Rivera, P. & F. Cruces. 2009. Diatomeas (Bacillariophyceae) de zonas andinas del Norte de Chile: nueva localidad geográfica para *Haloroundia speciosa* (Hustedt) Diaz et Maidana. *Gayana Botanica* 66(2): 280-282.

Rivkin, R.B. & M. Putt. 1987. Photosynthesis and cell division by the Antarctic microalgae: comparison of benthic, planktonic and ice algae. *Journal of Phycology* 23: 223–229

Roessler, P.G. 1988. Effects of silicon deficiency on lipid composition and metabolism in the diatom *Cyclotella cryptica*. *Journal of Phycology* 24: 394-400.

Round, F.E., R.M. Crawford & D.G. Mann. 1990. The diatoms. Biology and morphology of the genera. Cambridge University Press, New York, 747 pp.

Rumrich, U., H. Lange-Bertalot & M. Rumrich. 2000. Diatomeen der Anden von Venezuela bis Patagonien/Tierra del Fuego. *Iconographia Diatomologica* 9: 1-673.

Scholz, B. & G. Liebezeit. 2012. Growth responses of 25 benthic marine Wadden Sea diatoms isolated from the Solthörn tidal flat (southern North Sea) in relation to varying culture conditions, *Diatom Research* 27: 1, 65-73.

Shao, K.T. 2003-2014. *TaiBNET (Catalogue of Life in Taiwan)* <http://taibnet.sinica.edu.tw>. Taiwan. In: Guiry M.D. & Guiry G.M. 2014. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 16 December 2014.

Taguchi, S., J.A. Hirata & E.A. Laws. 1987. Silicate deficiency and lipid synthesis of marine diatoms. *Journal of Phycology* 23: 260-267.

Stoermer, F. & J.P. Smol. 1991. *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences*. Cambridge University Press, Cambridge.

Tomas, J. H. 1996. Effects of temperature and illuminance on cell division rates of three species of tropical oceanic phytoplankton. *Journal of Applied Physiology* 2: 17–22.

Thaler, M. & I. Kaczmarska. 2009. *Gyrosigma orbitum* sp. nov. (Bacillariophyta) from a salt marsh in the Bay of Fundy, eastern Canada. *Botanica Marina* 52: 60-68.

Thessen, A.E., Q. Dortch, M.L. Parsons & S. Mossison. 2005. Effect of salinity on *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) growth and distribution. *Journal of Phycology* 41: 21–9.

Tréguer, P., D.M. Nelson, A. J. Van Bennekom, D.J. Demaster, A. Leynaert & B. Queguiner. 1995. The silica balance in the world ocean: a reestimate. *Science* 268: 375-9.

Vargas, C., P. Acuna & I. Vila. 2004. Relación entre la calidad del agua y la biota en la cuenca Salar de Huasco. In: A. Fernández & V. Sánchez (eds.), *El agua en Iberoamérica: Experiencias en gestión y valoración del agua*, CYTED-XVII, pp. 145–152. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Buenos Aires.

Vila, I. & H. Muhlhauser. 1987. Dinámica de lagos de altura. Perspectivas de investigación. *Arch. Experimental Biology and Medicine* 20: 95-103.

Werner, D. 1978. Regulation of metabolism by silicate in diatoms. In: G. Bendez & I. Lindqvist (eds.), *Biochemistry of silicon and related problems*, pp. 149-179. Plenum, New York.

Whitton, B.A., D.M. John, M.G. Kelly & E.Y. Haworth. 2003. A coded list of freshwater algae of the British Isles. Second Edition. In: Guiry M.D. & Guiry G.M. 2014. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 16 December 2014.



CAPÍTULO III

Bioconcentration and biotransformation of arsenate by benthic diatom *Nitzschia epithemioides* Grunow in Cleve & Grunow (1880) under different phosphate concentrations

Eimmy E. Ramírez^{1*}, Jörg Feldmann², Andrea Raab² & Roberto E. Urrutia¹.

¹Aquatic Systems Unit/Environmental Science Center EULA-Chile, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

²Trace Element Speciation Laboratory/School of Engineering and Physical Sciences, University of Aberdeen, Aberdeen, AB24 3UE, Scotland, U.K.

*Autor para correspondencia: eimmy.ramirez@udec.cl; Fono: +56 41 2204054, Fax: +56 41 2207076

Submitted: *Aquatic Toxicology*.

Abstract

The present study evaluated the ability of benthic diatom *Nitzschia epithemioides*, isolated from an environment with high concentrations of naturally occurring arsenic to bioconcentrate and biotransform inorganic arsenic in axenic cultures exposed at different arsenate concentrations and phosphate regimes. The total arsenic concentration in the algal cells of *N. epithemioides* was always greater than the concentration in the cultures, although the bioconcentration factor decreases with increasing arsenate from the base level (<0.1 mg l⁻¹). Arsenate uptake by the microalgae at the end of the culture period was of 115 to 10480 µg g⁻¹ (dry weight) on cultures exposed to <0.1 and 1000 mg As^(V) l⁻¹ respectively, and phosphorus concentration equivalent to the f/10 medium. The results of the arsenic speciation analysis indicated that in the water-soluble extracts of *N. epithemioides* the predominant species in average was As^(V) (76 %), a minor proportion of three types of arsenosugars (1.27 %) and DMA^(V) (0.06 %), for cells harvested on day 4 and 8 of the culture period. Arsenolipids in the methanol/dichloromethanol extracts contained predominantly OH-ribose (23 %), and an unknown arsenic cation, on day 8 of the culture period, the greatest amount of OH-ribose was observed in cultures with f/2 medium. Overall our finding will facilitate the application of algae in arsenate remediation.

Keywords: arsenic species, biouptake, diatom, phosphate, toxicity.

INTRODUCTION

Arsenic is a toxic metalloid universally distributed in aquatic ecosystems (Smedley & Kinniburgh 2002). Its presence is due to both natural sources, such as volcanic action, and anthropogenic activities, such as smelting industry, burning of fossil fuels and use of arsenical pesticides in agriculture (Nriagu 1994). Its

concentration ranges from <1 to 5000 $\mu\text{g l}^{-1}$ and could even reach 8,50,000 $\mu\text{g l}^{-1}$ in mining drainages (Nordstrom & Alpers 1999).

Arsenic can exist in several oxidation states (+5, +3, 0, and -3) and chemical forms and its toxicity depends on its chemical speciation. The dominant species of arsenic in aquatic systems is arsenate, which is the thermodynamically stable form of inorganic arsenic in oxygenated waters (Edmonds & Francesconi 1993). Other inorganic species, such as arsenite, and a variety of organo-arsenicals, such as monomethylarsonate (MMA) and dimethylarsinate (DMA), have been also detected in the aquatic environments, their presence being correlated with biological activity (Anderson & Bruland 1991; Edmonds *et al.* 1997; Francesconi 2005). The production of arsenosugars in marine algae starts off with DMA(V) retained in the algal cells, which is thought to be reduced to DMA (III) and then oxidized by the addition of the adenosyl group from S-adenosylmethionine (SAM). This nucleoside then undergoes glycosidation to produce a range of arsenosugars (Edmonds & Francesconi 1987). The formation of arsenosugars has subsequently been detected in the diatom *Chaetoceros concavicornis* (Edmonds *et al.* 1997) and freshwater algae *Chlorella vulgaris* (Murray *et al.* 2003), *Chlorella* sp. (Levy *et al.* 2005) and *Monoraphidium arcuatum* (Levy *et al.* 2005). Also it has been speculated that microalgae sequester arsenic species into the lipids of cells (Lunde 1968; Irgolic *et al.* 1977; Wrench & Addison 1981). The lack of suitable techniques for arsenic lipid determination has hampered research in identifying arsenolipids in marine algae with detection and identification of arsenic lipids occurring mostly in marine macroalgae and marine animals or animal products (Morita & Shibata 1988; Hanaoka *et al.* 1999; 2001; Devalla & Feldmann 2003; Kohlmeyer *et al.* 2005; Schmeisser *et al.* 2005). Among these chemical species, inorganic arsenic is considered to be moderately toxic to marine microorganisms at high concentrations (Neff 1997). Various physicochemical and biological factors may influence the bioaccumulation and toxicity of different arsenic species in microorganisms. The phosphate content of the medium, pH, redox potential, temperature and light intensity are all reported to affect As bioaccumulation and toxicity (Yamaoka *et al.* 1999; Pawlik-Skowronska *et al.* 2004). The ability of the microorganism to accumulate, transform and detoxify arsenic (Yamaoka *et al.* 1999; Goessler *et al.* 1997; Neff 1997) also influences As toxicity. However, the mechanisms of isolation and detoxification for arsenic developed by microorganisms remain unclear. Algae have developed different ways to counter arsenate toxicity: (1) the affinity or number of arsenate transporters on the surface may decline and its intracellular content is thus reduced via uptake regulation (Karadjova *et al.* 2008). Arsenate accumulation could be further controlled by its excretion out of cells (Gupta *et al.* 2011), (2) arsenate could be reduced to arsenite which is then released to the ambient environment, scavenged by sulfur-containing compounds (e.g., glutathione and phytochelatin), or methylated to less toxic organic species (Pawlik-Skowronska *et al.* 2004; Zhao *et al.* 2009), (3) the subcellular distribution of arsenate might vary with its ambient concentration which could also alter its toxicity (Duncan *et al.* 2010; Miot *et al.* 2009).

Arsenate is an analogue of phosphate and is taken up by the cell through the phosphate uptake system (Ullrich-Eberius *et al.* 1989, Zhao *et al.* 2009). Its bioaccumulation may thus be lowered by phosphate especially in eutrophic waters (Guo *et al.* 2011). Biotransformation processes might also be obstructed by phosphate considering its non-specific binding to arsenate reductases (Hellweger *et al.* 2003; Markley & Herbert 2010; Slaughter *et al.* 2012). Further, it could be anticipated that arsenate's modes of toxic action (i.e., substitution of phosphate-containing biological molecules like phospholipids,

ADP, ATP, and ion-pumps) might depend on the phosphorus accumulated in cells (Miot *et al.* 2009). Therefore, phosphate is highly correlated to arsenate accumulation and biotransformation. A small variation in extracellular or intracellular phosphate concentrations may significantly change the toxicity of arsenate. However, no consensus is arrived at on these hypotheses (Xin Wang *et al.* 2013). Arsenate tolerance of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* was found to be unaffected by ambient phosphate concentration (Gong *et al.* 2009) and phosphate-limited (-P) *Chlorella* sp. did not show more sensitivity to arsenate (Knauer & Hemond 2000).

The aim of this study was to evaluate the ability of benthic diatom *Nitzschia epithemioides* in Cleve & Grunow Grunow (1880), isolated from an environment with high concentrations of naturally occurring arsenic to bioconcentrate and biotransform inorganic arsenic to organic arsenic compounds of lower toxicity. Which would further facilitate the application of algae in arsenate remediation.

MATERIALS AND METHODS

COLLECTION, ISOLATION AND MAINTENANCE OF STOCK CULTURES

The benthic microalgae used in this study was extracted from Huasco Lagoon, Salar del Huasco, located in the Altiplano (ca. 4000 m altitude), in northern Chile (20 ° 17'30 "S, 68 ° 52'20" W), Its maximum depth reaches 40 cm and has high concentrations of naturally occurring arsenic in its waters (ca. 12 mg l⁻¹).

To establish unialgal cultures, the isolation method used was single-cell isolation by micropipette and successive washes, according to the protocol described by Andersen Chapter 6 (2005). Finally non-axenic unialgal cultures of the microalgae grew in 250 ml Erlenmeyer flasks (ca. 50 ml culture volume) using f/2 culture medium as Guillard, 1975 (pH 8.00, salinity = 30 PSU), incubated at 80 μmol photons m⁻² s⁻¹ (LI-250 Light Meter, LI-COR. U.S.A.), at 20 ± 1 °C and with a L: D cycle of 18: 6 h.

On the other hand, the frustules were prepared for a scanning electron microscope (SEM) as described by Amato *et al.* (2005) and examined under a scanning electron microscope SEM JEOL JSM6380-LV. The morphology of the frustules were analyzed from photomicrographs taken with a camera (JSM-6830) attached to the SEM microscope. Taxonomic identification was performed based on the distinctive morphological characteristics of each taxon (Cleve-Euler 1953; Hustedt 1930; Krammer & Lange-Bertalot 1988, 1991, 2000, 2004). Strain of benthic diatom in study was deposited in the Culture Collection of Microalgae, University of Concepción (CCM-UdeC), Chile, under the number, CCM-UDEC 296.

To obtain axenic cultures of microalgae identified at specific level, as *Nitzschia epithemioides* Grunow in Cleve & Grunow (1880), a mixture of antibiotics was added to 50 ml of culture medium f/2, in dose of 200 ug ml⁻¹ penicillin G, 50 μg ml⁻¹ streptomycin sulfate and 25 ug ml⁻¹ gentamicin sulfate. After 24 h of growth of microalgae under photon microscopy the presence of bacteria was not observed, so an inoculum at f/2 medium fresh (without antibiotics) was added. To maintain exponential growth, 1 mL of stock culture was aseptically transferred to fresh medium f/2 sterile every 7 days. To cultures stock bacteriological tests were performed aseptically through scratched on bacto-agar plates each week.

ARSENATE EXPERIMENT

An inoculum of 1×10^3 cells ml^{-1} of *N. epithemioides* was incubated under sterile conditions in Erlenmeyer flasks containing 2 l of culture medium f/2 (Guillard 1975), with phosphorus in different concentrations equivalent to enrichment medium f/2 (5.65 mg l^{-1}), f/10 (1.13 mg l^{-1}) and f/20 (0.57 mg l^{-1}). For each treatment sodium arsenate (Na_2HAsO_4) was added in concentrations of 0, 10, 100 and 1000 mg l^{-1} on the second culture day (exponential growth phase). Cultures were maintained in an incubator under the same incubation conditions that for stock cultures, with mechanical aeration (using syringe filters of $0.2 \mu\text{m}$), during 8 days of culture. Three replicates were used. Cells were harvested on day 4 and 8 of the culture period by centrifugation at 2500g for 5 min. The supernatant was discarded and the cells within each phosphorus and arsenic treatment were pooled to obtain an adequate sample mass. Afterwards, previously frozen samples were lyophilized for 24-48 h.

To determine the effect of phosphorus and arsenic concentrations evaluated on growth of *N. epithemioides*, biomass was estimated as dry weight at the 4 and 8 days of the culture period.

INSTRUMENTATION

Analyses were carried out using Agilent instruments throughout (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), consisting of an Agilent HP 1100 HPLC system coupled in tandem with an Agilent 7500c series ICP-MS as elemental detector and Agilent 1100 LC/MSD ES-MS as molecular detector. The ICP-MS was optimised daily to obtain maximum sensitive.

SAMPLE PREPARATION FOR SPECIATION ANALYSIS

For speciation the microalgae were extracted by water. A minimum of 0.1 g of lyophilised sample was weighed into a 2 ml Eppendorf vial. 1 ml of distilled water was added and the suspension mixed for 4 hours at ambient temperature. A rotating shaker was used to achieve a homogeneous mixture. Afterwards the insoluble particles were removed immediately by centrifugation at 3000g for 10 min. The supernatant was stored and the same amount of water as used previously was added to the residue and again mixed for 4 hours at ambient temperature. The mixture was centrifuged again at 3000g for 10 min. The combined extracts were freeze-dried. This extraction procedure has been chosen, since numerous studies on arsenic in seaweed have shown that the majority of arsenic can easily be extracted by gentle water or water/methanol extraction.

After this first extraction. The supernatants (2 ml freeze-dry) was dissolved again in 1 ml water. Additionally 0.5 ml hydrogen peroxide (30%) was added to 0.5 ml of supernatant and allowed to react overnight at room temperature. The samples were then kept in a freezer at $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. To the residue, 1 ml of methanol/dichloromethanol (1:2 v/v) was added, the suspension was mixed for 2 hours on a rotary shaker at ambient temperature. Extraction solvents were evaporated to dryness using a RVC 2-18 rotary vacuum concentrator ($60 \text{ }^\circ\text{C}$). This procedure was repeated twice. Samples were then redissolved in 1 ml de methanol and left to stand for 24 hours at room temperature. The samples were stored in the freezer ($-18 \text{ }^\circ\text{C}$). On the day of analysis the samples were defrosted and centrifuged at 13 000g for 5 min to remove all precipitate.

ARSENIC SPECIATION USING HPLC-ICP-MS/ES-MS

The species of inorganic and organic arsenic analytes, along with the arsenosugars, were identified by comparison of retention time with standard mix of arsenic^{(III)/(V)}, DMA^(V) and MA^(V) with arsenic concentration of 50 ng ml⁻¹, which it was also used for quantification. Standard was also run to determine the retention times for the arsenosugars (Sugar 1, 2, 3 and 4, Fig. 1). The calibration curve used for quantification of the arsenosugars in the samples was that for the species nearest in retention time to the particular arsenosugar. Standard addition were performed to corroborate retention times and to investigate any potential matrix effects. The ICP-MS was set up in standard mode, with 50 µg l⁻¹ rhodium added post-column via a Teflon T-piece as internal standard. Arsenic and rhodium were measured on *m/z* 75 and 103 respectively. Anion-exchange chromatography was used for the determination of arsenic species in the algae. The high-performance liquid chromatography (HPLC) column was a Hamilton PRP-X100 (4.6 x 250 mm) directly coupled to the ICP mass spectrometer as described previously (Castlehouse et al., 2003). As mobile phase an aqueous solution of 12.5 Mm ammonium carbonate was prepared. Chromatographic run time: 45 min. Column temperature: 303 K. Flow rate: 1.3 ml min⁻¹. Eluent flow was split 1 : 4 to the ICP-MS and ES-MS respectively. For the calibration a stock solution of DMA was diluted with deionised water to 1, 10, 100 and 1000 ng ml⁻¹. Calibration was done before and after the sample measurements.

For speciation of lipids arsenic. The ICP-MS was set up to measured arsenic, sulfur and phosphorus on *m/z* 75, 32 and 31 respectively. No internal standard was used during analysis. An Agilent Eclipse XDB C18-column (4.6 x 150 mm) (Agilent Technologies) was used for chromatographic separation (Wood et al., 2011). Chromatographic run time: 45 min. Column temperature: 293 K. Flow rate: 1 ml min⁻¹. Eluent flow was split 1 : 3 to the ICP-MS and ES-MS respectively.

STATISTICAL ANALYSIS

To determine significant differences on the biomass of diatoms versus treatment with different concentrations of arsenic and phosphorus in culture medium f/2, comparisons were performed using one-way analysis variance (ANOVA), followed by multiple comparisons with a Tukey's test. A value of *p* < 0.05 was considered significant. All of the statistical analysis was performed using the software SigmaPlot, version 11.0 (Systat Software Inc.).

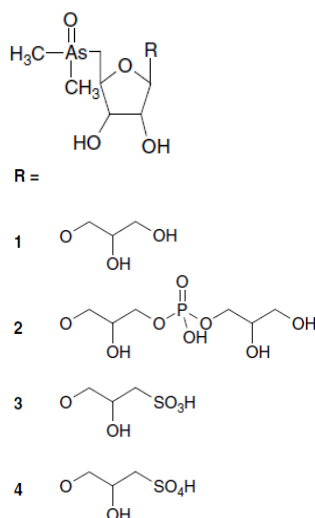


Figure 1. Generic structure of arsenosugars. Structures are: (1) sugar-OH; (2) sugar-PO₄; (3) sugar-SO₃H; (4) sugar-OSO₃H.

RESULTS

GROWTH OF N. epithemioies IN BATCH CULTURES

Harvested cells on day 4 of the culture period (Fig. 2 A), showed significant differences ($p < 0.001$) in the biomass production for the three phosphorus concentrations evaluated. The highest and lowest growth in biomass was observed in cultures incubated in f/10 medium (12.10 ± 1.21 mg DW) and f/20 medium (7.55 ± 2.52 mg DW), respectively. All of the pairwise multiple comparison procedures based on the Tukey Test were significant ($p < 0.05$) for the cultures incubated in f/10 and f/20 medium and the cultures incubated in f/10 and f/2 medium.

For harvested cells on day 8 of the culture period (Fig. 2 B), significant differences ($p < 0.001$) were found in the biomass production for all phosphorus concentrations evaluated. The highest and lowest growth in biomass was observed in cultures incubated in f/2 medium (64.36 ± 14.09 mg DW) and f/20 medium (22.63 ± 0.98 mg DW), respectively. All of the pairwise multiple comparison procedures based on the Tukey Test were significant ($p < 0.05$) for the cultures incubated in f/2 and f/20 medium and the cultures incubated in f/2 and f/10 medium.

Biomass showed no significant differences among cultures incubated with As^(V) (0, 10, 100 y 1000 mg l⁻¹) for the different phosphorus concentrations (0.6–6 mg L⁻¹) evaluated.

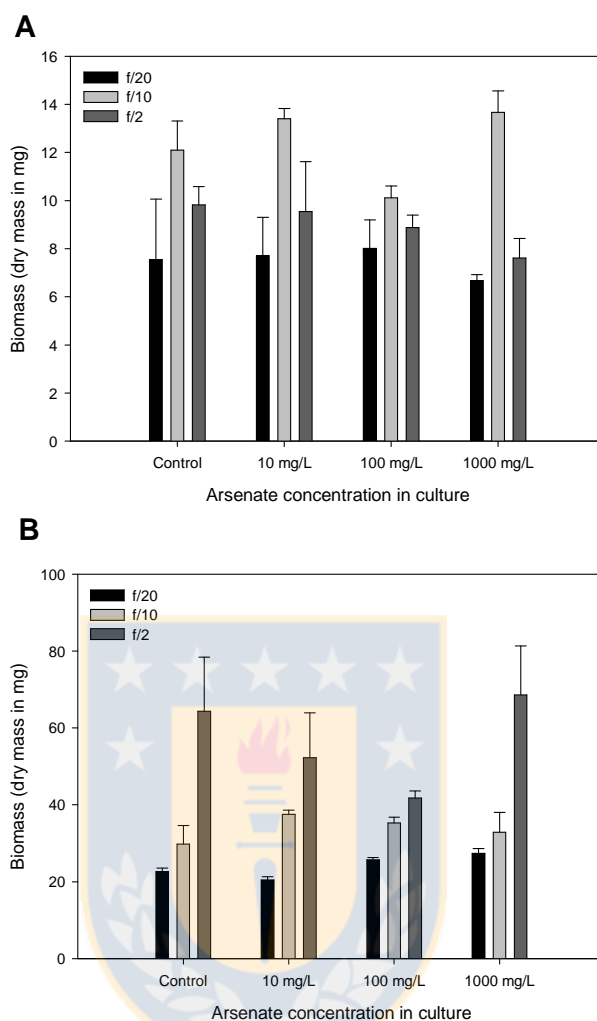


Figure 2. Biomass determination of *Nitzschia epithemioides* in 2 l of culture containing different concentrations of phosphorus and arsenic as arsenate. (A) harvested cells on day 4, and (B) harvested cells on day 8 of the culture period.

ARSENIC UPTAKE BY MICROALGAE

The reported results for total arsenic in algal cells given in Table I. correspond to the sum of all organic and inorganic species of arsenic detected and quantified by HPLC-ICP-MS/ES-MS. We observed that increasing the arsenic concentration in the cultures leads to an increase of the arsenic concentration in the biomass. The bioconcentration factor decreases over 1000-fold from the background arsenic concentration to the highest arsenic concentration used for incubation.

The extraction efficiency of the water-soluble arsenic species in *N. epithemioides* (Table II) was above 87% of the total arsenic for cultures with 10 and 1000 mg l⁻¹ As^(V) at phosphate concentrations f/20 and f/10. For the cultures incubated in f/2 medium, the extraction efficiency was over 70 y 85% at 10 and 1000 mg l⁻¹ As^(V), respectively.

Table I. Total arsenic (per gram of dried algal cells) extracted from algal cells determined by HPLC-ICP-MS.

Treatment	As ^V treatment (mg l ⁻¹)	Algal As (µg g ⁻¹)	Bioconcentration factor
f/20	< 0.1	115.43	1154.30
	10	2402.06 ^a	240.21
	1000	6957.39 ^b	6.96
f/10	10	2117.33 ^a	211.73
	1000	10483.14 ^b	10.48
f/2	10	2295.16 ^a	229.52
	1000	7334.58 ^b	7.33

^{a, b} The same letters beside the averages denote results that are not significantly different in ANOVA and Tukey's test pairwise comparison ($p < 0.05$ significance level).

Table II. Arsenic (per gram of dried algal cells) measured in water/peroxide (1: 1) extraction for speciation and methanol/dichloromethanol (1: 2) extraction for residues of *N. epithemioides*.

Treatment	As ^V treatment (mg l ⁻¹)	As concentration (µg g ⁻¹)			Extraction efficiency %
		H ₂ O – H ₂ O ₂	MeOH – DCM	Total	
f/20	< 0.1	6.78	108.65	115.43	5.87
	10	2249.86	152.20	2402.06	93.66
	1000	6780.79	176.60	6957.39	97.46
f/10	10	1848.47	268.86	2117.33	87.30
	1000	10292.33	190.81	10483.14	98.18
f/2	10	1686.06	609.10	2295.16	73.46
	1000	6284.38	1050.20	7334.58	85.68

ARSENIC SPECIES

Detection and quantification of species of arsenic was performed in the cultures treated with arsenate at 10 and 1000 mg L⁻¹, due to algal cells had higher growth compared to the control on these concentrations.

Speciation of arsenosugars and other ionic species-anion exchange HPLC (PRP-X100)

The water/H₂O₂ *N. epithemioides* extracts for harvested cells on day 4 of the culture period, contained predominantly arsenic (V); a minor proportion of sugar-OH, sugar-SO₃H, sugar-PO₄; and DMA (Table III, Fig. 3 A and B). The harvested cells on day 8 of the culture period, contained predominantly arsenic (V); a minor proportion of sugar-SO₃H, sugar-OH, sugar-PO₄; and DMA (Table IV, Fig. 3 C).

Arsenic lipid- complexed speciation analysis-reversed-phase RP-HPLC (XDB C18-column)

The arsenic species in the methanol/DCM *N. epithemioies* extracts, were predominantly anions, OH-ribose, and an unknown arsenic cation (Table V, Fig. 3 D).



Table III. Concentrations of arsenic species (dry weight) in the Water-soluble *Nitzschia epithemioies* extracts on day 4 of culture, for different phosphate conditions, all other nutrients at f/2 concentrations, determined by anion exchange chromatography on a PRP-X100 column.

Treatment	As ^V treatment (mg l ⁻¹)	Arsenic species concentration ^a (µg g ⁻¹)							
		Sugar-OH	As ^{III}	DMA	MA	Sugar-PO ₄	Sugar-SO ₃ H	As ^V	Total
	Control	0.23	n.d	n.d	n.d	n.d	0.60	5.95	6.78
f/20	10	7.48	n.d	2.43	n.d	n.d	7.56	3000.71	3018.18
	1000	14.91	n.d	2.27	n.d	n.d	47.24	27839.45	27903.87
f/10	10	15.24	n.d	2.54	n.d	3.61	18.88	7123.92	7164.19
	1000	15.02	n.d	4.97	n.d	6.88	40.36	13427.46	13494.69
f/2	10	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2012.64	2012.64
	1000	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	21301.44	21301.44

n.d. – not detected <0.01 µg g⁻¹.

Table IV. Concentrations of arsenic species (dry weight) in the Water-soluble *Nitzschia epithemioies* extracts on day 8 of culture, for different phosphate conditions, all other nutrients at f/2 concentrations, determined by anion exchange chromatography on a PRP-X100 column.

Treatment	As ^V treatment (mg l ⁻¹)	Arsenic species concentration ^a (µg g ⁻¹)							
		Sugar-OH	As ^{III}	DMA	MA	Sugar-PO ₄	Sugar-SO ₃ H	As ^V	Total
	Control	0.23	n.d	n.d	n.d	n.d	0.60	5.95	6.78
f/20	10	0.26	n.d	0.15	n.d	n.d	0.67	2248.78	2249.86
	1000	16.96	n.d	1.76	n.d	5.31	69.54	6687.22	6780.79
f/10	10	27.26	n.d	2.39	n.d	7.37	10.73	1800.72	1848.47
	1000	15.55	n.d	1.99	n.d	7.33	17.09	10250.37	10292.33
f/2	10	33.71	n.d	3.16	n.d	3.76	44.89	1600.54	1686.06
	1000	9.40	n.d	9.79	n.d	8.10	32.47	6224.62	6284.38

n.d. – not detected <0.01 µg g⁻¹.

Table V. Concentrations of lipids arsenic species (dry weight) in the methanol/DCM *Nitzschia epithemioides* extracts on day 8 of culture, for different phosphate conditions, all other nutrients at f/2 concentrations, determined by cation exchange chromatography on a XDB C18 column.

Treatment	As ^V treatment (mg l ⁻¹)	Arsenic species concentration ^a (μg g ⁻¹)		
		OH-ribose	U1	Total
>0.1	Control	71.21	37.44	108.65
f/20	10	114.89	37.31	152.20
	1000	133.02	43.58	176.60
f/10	10	157.14	111.72	268.86
	1000	111.78	79.03	190.81
f/2	10	498.00	111.10	609.10
	1000	945.32	104.88	1050.20

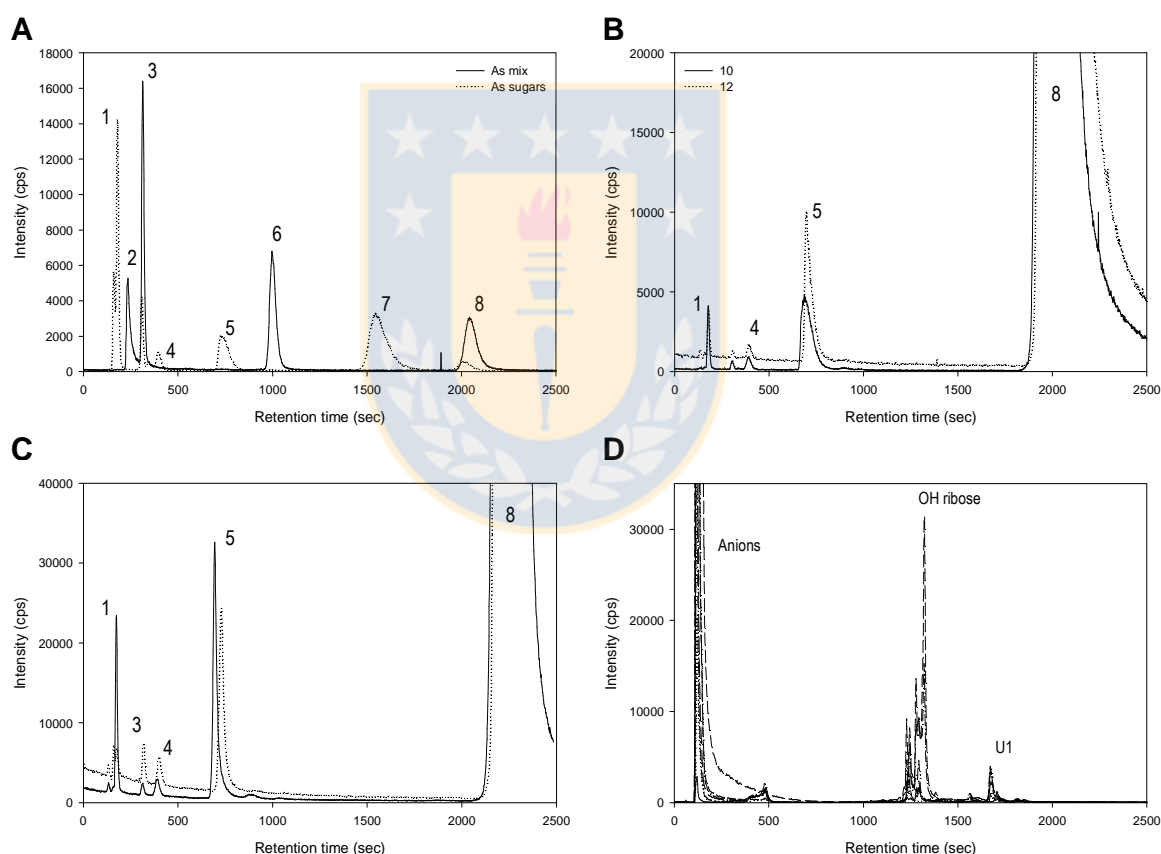


Figure 3. ICP-MS chromatogram of m/z 75 for standard mix of arsenic^(III)(^V), DMA^(V) and MA^(V) (solid line) and standard sugars (dashed line) (A), chromatogram for *N. epithemioides* water/H₂O₂ extract exposed to 10 (solid line) and 1000 (dashed line) mg l⁻¹ arsenic^(V) using anion-exchange chromatography coupled to ICP-MS on day 4 of culture (B), and on day 8 of culture (C), chromatogram for *N. epithemioides* MeOH/DCM extract exposed to 10 (solid line) and 1000 (dashed line) mg l⁻¹ arsenic^(V) using cation-exchange chromatography coupled to ICP-MS on day 8 of culture (D). Peaks are labelled as follows: (1) sugar-OH; (2) As^{III}; (3) DMA^(V); (4) sugar-PO₄; (5) sugar-SO₃H; (6) MMA^(V); (7) sugar-OSO₃H; (8) As^V.

DISCUSSION

GROWTH OF *N. epithemioides* IN BATCH CULTURES

Should be mentioned that cell numbers indicated exponential growth until day 5 and that cultures were entering stationary phase by day 8 (data not shown in this article). *N. epithemioides* growth was affected by the different phosphorus concentrations evaluated in the culture medium. Biomass (dry mass in mg) observed the fourth day of the culture period, was higher for the f/10 medium and not to the medium f/2 as expected, because the latter has a higher concentration of phosphate. A possible explanation would be that, perhaps, the cultures in f/2 medium received an inoculum of cell lower ($< 1 \times 10^3$ cel ml⁻¹) than the others medium, and the cultures need more time to achieve growth that corresponding to the amounts of added phosphorus. The biomass at the end of the culture period (day 8) presented the expected behavior in terms of growth, with greater biomass in the culture medium with a higher concentration of phosphorus and disminución of biomass for phosphorus concentrations lower (f/2 > f/10 > f/20).

N. epithemioides growth was not significantly affected by arsenic at concentrations of 10, 100 and 1000 mg l⁻¹ As^(V) in the cultures incubated with the three phosphorus concentrations evaluated. However, on day 4 of the culture period, in f/10 medium a trend to higher growth to 10 and 1000 mg l⁻¹ As^(V) with respect to control was observed, and a decrease in biomass to 1000 mg l⁻¹ As^(V) compared to control in the f/2 medium. At the end of the culture period, a trend toward lower biomass compared to the control in f/2 medium at 10 and 1000 mg l⁻¹ As^(V) was observed; and a slight increase in biomass compared to the control in the f/10 medium at 10, 100 and 1000 mg l⁻¹ As^(V). Murray *et al.* (2003), as in this study, found no significant difference in the growth of microalgae *Chlorella vulgaris* cultivated with arsenate in concentrations of 0, 10, 100 and 1000 mg l⁻¹ and reported an increase in biomass production between the arsenate treatment of the 100 mg l⁻¹ tanks and the tanks containing 1000 mg l⁻¹. It is still unclear whether arsenic has an influence on the metabolism of the algae.

ARSENIC UPTAKE BY MICROALGAE

The total arsenic concentration in the algal cells of *N. epithemioides* was always greater than the concentration in the cultures, although the BCF decreased with increasing arsenate from the base level (<0.1 mg l⁻¹). Arsenate uptake in the range of 115 to 10480 ug g⁻¹ in the present study was comparable to what reported in the freshwater green algae *Chamydomonas reinhardtii* and *Scenedesmus obliquus* (2.62 to 1547.0 ug g⁻¹ h⁻¹) (Xing Wang *et al.* 2013), and in the freshwater alga *Chlorella vulgaris* (17.2 to 2739 ug g⁻¹) (Murray *et al.* 2003).

ARSENIC SPECIES

The water-soluble extracts of *N. epithemioides* contained predominantly inorganic arsenic (>80%), both algal cells harvested on day 4 and 8 of the culture period. However, the amount of As^(V) reported to day 4 was higher than that reported to day 8 at 10 and 1000 mg l⁻¹ As^(V) in all phosphorus concentrations evaluated (Table III and IV). Metabolism of arsenic in the media has been shown to occur quickly with arsenic being taken up and transformed within 48-96 h of arsenate addition to growth media (Sanders & Windom 1980). On the other hand, large part of inorganic arsenic and methylarsenicals could have been

released to the medium under conditions of excessive arsenate uptake towards the end of the culture period. Significant amounts of inorganic arsenic can be sequestered into vacuoles through a widespread detoxification mechanism, developed by plants and algae to avoid metal poisoning, involves intracellular glutathione-related peptides. These compounds, named phytochelatins (PC) are cysteine-rich peptides with general structure $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, with n values generally ranging from 2 to 6 (Grill *et al.* 1985). They are enzymatically synthesized by a specific transpeptidase, the phytochelatin synthase, which is activated by the presence of metal ions and uses glutathione as substrate (Grill *et al.* 1989). Their detoxifying function consists in the ability to bind metals in stable complexes, which effectively reduce the intracellular concentration of potentially toxic free metal ions. Only recently the ability of arsenate anions to trigger the formation of PC has been demonstrated in variety of terrestrial plants (Sneller *et al.* 1999; Schmöger *et al.* 2000; Hartley-Whitaker *et al.* 2002; Bleeker *et al.* 2003; Zhao *et al.* 2003; Reina *et al.* 2005), in a freshwater green alga *Stichococcus bacillaris* (Pawlik-Skowronska *et al.* 2004) and the marine diatom *Phaeodactylum Tricornutum* (Morelli *et al.* 2005).

The higher concentrations of inorganic arsenic in *N. epithemioides*, suggests that methylation of arsenic is less pronounced in this microalgae or methylated arsenic species are quickly excreted to the medium. Our results were similar to those reported by Murray *et al.* (2003), in the microalgae *Chlorella vulgaris*, cultivated in medium with arsenate concentration of <0.01 , 10, 100 and 1000 mg l⁻¹, in these experiments DMA(V) was found and MA(V) appears to be absent or was quickly excreted.

Arsenosugars were found in low proportion (0.45-1.68%) for cells harvested on day 4 (sugar-OH, sugar-SO₃H and sugar-PO₄) and on day 8 (sugar-SO₃H, sugar-OH and sugar-PO₄) of the culture period. Foster *et al.* (2008) reported for *P. Tricornutum* more phosphate arsenoribose (PO₄-ribose) and small amounts of OH-ribose (by mass). Macroalgae often have a higher proportion present as the OH-ribose (Brown algae: 1:4.8 – 1:20.5; Red algae: 1:1.5; Green algae: 1:1.6 – 1:6.1) (Tukai *et al.*, 2002). Edmonds *et al.* (1997) reported the presence of OSO₃-riboses and small amounts of PO₄-ribose in water-soluble extracts of the diatom *Chaetoceros concaviconis*.

Arsenic lipids in the MeOH/DCM extracts of *N. epithemioides* contained predominantly OH-ribose (32%) (Fig. 4), and an unknown arsenic cation (14%), the greatest amount of OH-ribose was observed in cultures with f/2 medium (Table V, Fig. 3 D). Reitan *et al.* (1994) found an increase in total lipid formation in the diatom *P. Tricornutum* and *Chaetoceros* sp. in phosphorus limiting cultures. In contrast a decrease in total lipid was found for the green microalgae *Nannochloris atomus* and *Tetraselmis* sp. under similar limiting phosphorus conditions. Foster *et al.* (2008) found in axenic cultures of the microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum* contained substantial quantities of OH-ribose and As(V) in acid hydrolysed lipid extracts. *D. tertiolecta* also contained substantial quantities of DMA. The presence of the OH-ribose and DMA moieties in arsenic lipids is supported by previous research (Morita & Shibata 1988; Devalla & Feldmann 2003). Foster *et al.* (2008) also reported an unknown arsenic cation that co-chromatographed with DMAE was also found in hydrolysed extracts but concentrations were not high enough to determine its identity by LC-MC. Both Lunde (1968) and Irgolic *et al.* (1977) suggest that arsenic lipids in microalgae are phospholipids. The sequestration of arsenic species within storage lipids rather than in polar lipids associated with the chloroplast would reduce the likelihood of arsenic species interfering in energy production.

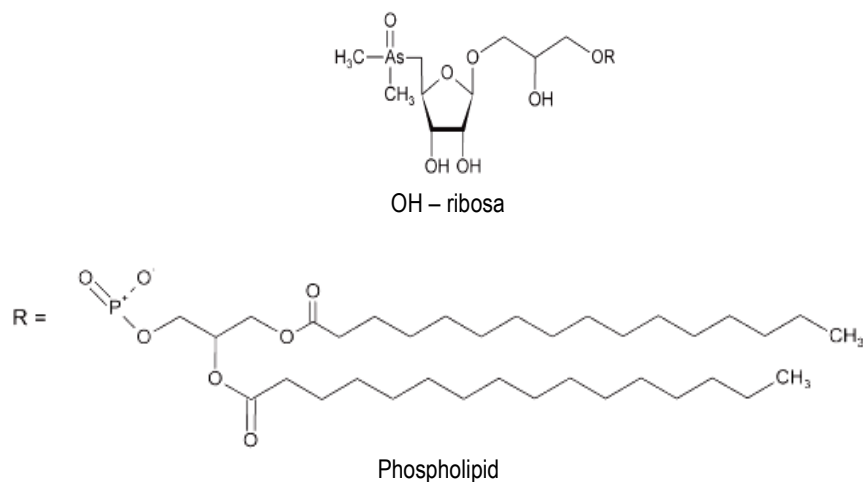


Figure 4. Possible arsenic lipid generic structure.

Acknowledgments

We thank Professor Jörg Feldmann (Department of Chemistry in the School of Engineering and Physical Sciences) for the support of this study. This work was funded by Fondecyt N° 1120807 and project “CRHIAM /CONICYT/FONDAP/15130015”.

REFERENCES

- Amato A, Orsini L, D’Alelio D, and Montesor M. (2005). Life cycle, size reduction patterns, and ultrastructure of the pennate planktonic diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 41, 542-556.
- Andersen, R.A. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Phycological Society of America, Elsevier Academic Press. Ed. Andersen R.A., Amsterdam. 578 pp.
- Anderson L.C.D., Bruland K. W. 1991. Biochemistry of arsenic in natural water: the importance of methylated species. *Environ Sci Technol*, 25, 420-427.
- Bleeker P.M., Schat H., Vooijs R., Verkleij J.A.C., Ernst W.H.O. 2003. Mechanisms of arsenate tolerance in *Cytisus striatus*. *New Phytol.* 157, 33–38.
- Castlehouse H, Smith C, Raab R, Deacon C, Meharg AA, Feldman J. 2003. Biotransformation and Accumulation of Arsenic in Soil Amended with Seaweed. *Environ. Sci. Technol.* 37, 951-957.
- Cleve-Euler, A. 1953. Die Diatomeen von Schweden und Finnland. Part II, Arraphideae, Brachyraphideae. *Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar* ser. 4, 3/5: 1-255 pp.

Devalla S, Feldmann J. 2003. Determination of lipid-soluble arsenic species in seaweed-eating sheep from Orkney. *Appl. Organomet. Chem.* 17, 906-912.

Duncan E., Foster S., Maher W. 2010. Uptake and metabolism of arsenate, methylarsonate and arsenobetaina by axenic cultures of the phytoplankton *Dunaliella tertiolecta*. *Botanica Marina.* 53, 377-386.

Edmonds J.S, Francesconi K.A. 1987. Transformations of arsenic in the marine environment. *Experientia.* 43, 553-557.

Edmonds J.S, Francesconi K.A. 1993. Arsenic in the sea. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev*, 31, 111-151.

Edmonds J.S, Shibata Y, Francesconi K.A, Rippington R.J, Morita M. 1997. Arsenic transformations in short marine food chains studies by HPLC-ICP-MS. *Appl. Organomet. Chem.* 11, 281-287.

Francesconi K. A. 2005. Current perspectives in arsenic environmental and biological research. *Environ. Chem.* 2, 141-145.

Goessler W., Lintschinger J., Szakova J., Mader P., Kopecky J., Douch J., Irgolic K.J. 1997. *Chlorella* sp. and arsenic compounds: an attempt to prepare an algal reference material for arsenic compounds. *Appl. Organomet. Chem.* 11, 57-66.

Gong Y., Chou H.-N., Tu C.-D., Liu X., Liu J., Song L. 2009. Effects of arsenate on the growth and microcystin production of *Microcystis aeruginosa* isolated from Taiwan as influenced by extracellular phosphate. *Journal of Applied Phycology.* 21, 225-231.

Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feed marine invertebrates. In: W.L. Smith & M. H. Chanley (eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*, pp. 29-60. Plenum Press, New York.

Guo P., Gong Y., Wang C., Liu X., Liu J. 2011. Arsenic speciation and effect of arsenate inhibition in a *Microcystis aeruginosa* culture medium under different phosphate regimes. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 30, 1754-1759.

Gupta D.K., Srivastava S., Huang H.G., Romero-Puertas M.C., Sandalio L.M. 2011. In: Sherameti I., Varma A. (Eds.), *Detoxification of Heavy Metals*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H. 1985. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230, 674-676.

Grill E., Löffler S., Winnacker E.L., Zenk M.H. 1989. Phytochelatins, the heavy-metal-binding-peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific c-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). Proc Natl Acad Sci USA 86, 6838–6842.

Hanaoka K., Goessler W., Yoshida K., Fujitaka Y., Kaise T., Irgolic K.J. 1999. Arsenocholine and dimethylated arsenic-containing lipids in starspotted shark *Mustelus manazo*. Appl. Organomet. Chem. 13, 765-770.

Hanaoka K., Tanaka A., Nagata Y., Yoshida K., Kaise T. 2001. Water-soluble arsenic residues from several arsenolipids occurring in the tissues of the starspotted shark *Musterus manazo*. Appl. Organomet. Chem. 15, 299-305.

Hartley-Whitaker J., Woods C., Meharg A.A. 2002. Is differential phytochelatin production related to decreased arsenate influx in arsenate tolerant *Holcus lanatus*?. New Phytol 155, 219–225.

Hasle G. R., Fryxell, G. A. 1970. Diatoms: cleaning and mounting for light and electron microscopy. Trans. Am. Microsc. Soc. 89: 469–74.

Hellweger F.L., Farley K.J., Lall U., Di Toro D.M. 2003. Greedy algae reduce arsenate. Limnology and Oceanography. 48, 2275-2288.

Hustedt F. 1930. Bacillariophyta (Diatomae). In: A. Pascher (eds.), Die Süßwasser-flora Mitteleuropas, vol. 10, pp. 466. Gustav Fischer, Jena.

Irgolic K.J, Woolson E.A, Stockton R.A, Newman R.D, Bottino N.R, Zingaro R.A, Kearney P.C, Pyles R.A, Shigeru M, McShane W.J, Cox E.R. 1977. Characterization of arsenic compounds formed by *Daphnia magna* and *Tetraselmis chuii* from inorganic arsenate. Environ. Health Perspect. 19, 61-66.

Knauer K., Hemond H. 2000. Accumulation and reduction of arsenate by the freshwater green alga *Chlorella* sp (Chlorophyta). Journal of Phycology 36, 506-509.

Karadjova I.B., Slaveykova V.I., Tsalev D.T. 2008. The biouptake and toxicity of arsenic species on the green microalga *Chlorella salina* in seawater. Aquatic Toxicology. 87, 264-271.

Kohlmeyer U, Jakubik S, Kuballa J, Jantzen E. 2005. Determination of arsenic species in fish oil after acid digestion. Microchim. Acta 151, 249-255.

Krammer, K. & H. Lange-Bertalot. 1988. Bacillariophyceae 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. In: H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa. G. Fischer, Jena.

Krammer, K. & H. Lange-Bertalot. 1991. Bacillariophyceae 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. In: H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa, 437 pp. Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.

Krammer, K. & H. Lange-Bertalot. 2000. Bacillariophyceae 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. In: H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa, 598 pp. Fischer Verlag, Stuttgart, Stuttgart, Germany.

Krammer, K. & H. Lange-Bertalot. 2004. Bacillariophyceae 4. Teil: Achnantheaceae Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema. In: H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa, G. Fischer, Jena.

Levy J.L, Stauber J.L, Adams M, Maher W.A, Kirby J, Jolley D. 2005. Toxicity, biotransformation and mode of action of arsenic in two freshwater microalgae (*Chlorella* sp. And *Monoraphidium arcuatum*). Environ. Toxicol. Chem. 24 (10), 2630-2639.

Lunde G. 1968. Analysis of arsenic in marine oils by neutron activation energy, evidence of arseno organic compounds. J. Am. Oil Chem. Soc. 45, 331-332.

Markley C.T., Herbert B.E. 2010. Modeling phosphate influence on arsenate reduction kinetics by freshwater Cyanobacterium. Environmental Modeling & Assessment. 15, 361-368.

Miot J., Morin G., Skouri-Panet F., Ferard C., Poitevin A., Aubry E., Ona-Nguema G., Juillot F., Guyot F., Brown Jr. G.E. 2009. Speciation of arsenic in *Euglena gracilis* cells exposed to As (V). Environmental Science & Technology. 43, 3315-3321.

Morelli E., Mascherpa M.C, Scarano G. 2005. Biosynthesis of phytochelatins and arsenic accumulation in the marine microalga *P. Tricornutum* in response to arsenate exposure. BioMetals. 18, 587-593.

Morita M., Shibata Y. 1988. Isolation and identification of arsenolipid from a brown alga, *Undaria pinnatifida* (Wakame). Chemosphere. 17, 1147-1152.

Murray L.A, Raab A, Marr I.L, Feldmann J. 2003. Biotransformation of arsenate to arsenosugars by *Chlorella vulgaris*. Appl. Organomet. Chem. 17, 669-674.

Neff J.M. 1997. Review: ecotoxicology of arsenic in the marine environment. Environ. Toxicol. Chem. 16:917-927.

Nordstrom D.K., Alpers C.N. 1999. Negative pH, efflorescent mineralogy, and consequences for environmental restoration at the Iron Mountain Superfund site, California. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96,3455-3462.

Nriagu J.O., Pacyna J.M. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water, and soils by trace metals. *Nature*, 333, 134-139.

Pawlik-Skowronska B, Pirszel J, Kalinowska R, Skrowronski T. 2004. Arsenic availability and direct role of GSH and phytochelatins in As detoxification in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Aquat. Toxicol.* 70, 201-212.

Reina S.V, Esteban E., Goldsbrough P. 2005. Arsenate-induced phytochelatins in white lupin: influence of phosphate status. *Physiol Plant.* 124, 41-49.

Reitan K.I., Rainuzzo J.R., Olsen Y. 1994. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J. Phycol.* 30, 972-979.

Schmeisser E, Goessler W, Kienzl N, Francesconi K.A. 2005. Direct measurement of lipid-soluble arsenic species in biological samples with HPLC-ICPMS. *Analyst* 130, 948-955.

Slaughter D.C., Macur R.E., Inskeep W.P. 2012. Inhibition of microbial arsenate reduction by phosphate. *Microbiological Research.* 167, 151-156.

Smedley P.L, Kinniburgh D.G. 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem.*, 17(5), 517-568.

Schmöger M.E.V., Oven M., Grill E. 2000. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiol* 122, 793-801.

Sneller F.E.C, Van Heerwaarden L.M, Kraaijeveld-Smit F.J.L. 1999. Toxicity of arsenate in *Silene vulgaris*: accumulation and degradation of arsenate-induced phytochelatins. *New Phytol.* 144, 223-232.

Tukai R., Maher W.A., McNaught I.J., Ellwood M.J., Coleman M. 2002. Occurrence and chemical form of arsenic in marine macroalgae from the east coast of Australia. *Mar. Freshw. Res.* 53, 971-980.

Ullrich-Eberius C.I., Sanz A., Novacky A.J. 1989. Evaluation of arsenate and vanadate associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1. *J. Exp Bot.* 40, 119-128.

Wang N.X., Li Y., Deng X.H., Miao A.J., Ji R., Yang L.Y. 2013. Toxicity and bioaccumulation kinetics of arsenate in two freshwater green algae under different phosphate regimes. *Water Research.* 47, 2497-2506.

Wood B.A, Miyashita S, Kaise T, Raab A, Meharg A.A, and Feldmann J. 2011. Arsenic is not stored as arsenite-phytochelatin complexes in the seaweeds *Fucus spiralis* and *Hizikia fusiforme*. *Environ. Chem.* 8, 30-43.

Wrench J-J, Addison R.F. 1981. Reduction, methylation and incorporation of arsenic into lipids by the marine phytoplankton *D. Tertiolecta*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38, 518-523.

Yamaoka Y., Takimura O., Fuse H., Murakami K. 1999. Effect of glutathione on arsenic accumulation by *Dunaliella salina*. *Appl. Organomet. Chem.* 13, 89-94.

Zhao F.J., Wang J.R., Barker J.H.A., Schat H., Bleeker P.M., McGrath S.P. 2003. The role of phytochelatins in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytol.* 159, 403–410.

Zhao F.J., Ma J.F., Meharg A.A., McGrath S.P. 2009. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist.* 181, 777-794.



DISCUSIÓN GENERAL

La información científica existente sobre ecología, taxonomía y cultivo de microalgas de ecosistemas salinos de altura en Chile y Sudamérica es escasa. Estudios realizados en sistemas acuáticos representativos del altiplánico Chileno, señalan a las diatomeas como el grupo algal más importante en cuanto abundancia, siendo estas más tolerantes a la elevada salinidad de estos sistemas y, por ello, la base de la cadena trófica, especialmente como dieta de aves acuáticas (p.e., flamencos) (Vargas *et al.* 2004; Márquez-García *et al.* 2009). Dorador *et al.* (2003) indicaron que la riqueza microalgal es relativamente baja en estos sistemas y que las especies dominantes en lugar de ser endémicas, son más o menos cosmopolitas, presentando probablemente adaptaciones a las condiciones ambientales cambiantes de este tipo de hábitat. Los taxa de diatomeas investigadas en este estudio generalmente son epipélicas, pero algunas son realmente planctónicas y perifíticas. Se encuentran en agua dulce, salobre y hábitats marinos. La diatomea *N. epithemioides*, presentó altas tasas de crecimiento exponencial, altas densidades celulares y capacidad de tolerar diferentes condiciones de temperatura, densidad de flujo fotónico y concentración de silicatos y selenio. En *N. epithemioides* se observó también una mayor tolerancia a elevadas concentraciones de arsenato en el medio de cultivo, por lo que fue seleccionada para iniciar investigaciones orientadas a evaluar la capacidad del taxon de bioconcentrar y biotransformar el arsénico inorgánico, ya que, laguna Huasco presenta elevadas concentraciones del metaloide en sus aguas (ca. 12 mg L⁻¹).

Para la mayoría de los organismos la exposición a metales pesados y metaloides como el As, por encima de una concentración umbral, puede ser extremadamente tóxica. Esto sugiere que los organismos tienden a desarrollar mecanismos de aislamiento y detoxificación de arsénico, produciendo compuestos metilados y compuestos organo-arsenicales más elaborados de menor toxicidad que las formas inorgánicas (Anderson & Bruland 1991). La absorción de As por las microalgas en ambientes contaminados con el metaloide a menudo exceden ampliamente las concentraciones encontradas en ambientes no contaminados (Planas & Healey 1978; Sanders & Windom 1980; Cullen *et al.* 1994). Lo que demuestra, que las microalgas tienen una alta capacidad de acumular As, pueden influir en la concentración de arsénico total y en la proporción de especies de As inorgánicas y orgánicas del medio que las rodea.

En estudios de cultivos de microalgas, se ha demostrado que la presencia de fosfato tiene diferentes efectos sobre la absorción de arsenato, ya sea por la absorción reducida de As en condiciones de abundancia de fosfato (Sanders & Windom, 1980) o la absorción simultánea de arsénico y fosfato (Andreae & Klumpp, 1979). Es evidente que la proporción de As/P influye en las concentraciones de As en las microalgas marinas, pero esta respuesta no es consistente en todas las especies del fitoplancton (Foster *et al.* 2008).

Los resultados del estudio confirman la capacidad de *N. epithemioides* de tolerar elevadas concentraciones de arsénico. La concentración total de As más elevada al final del periodo de cultivo (día 8), fue de 115 a 10480 µg g⁻¹ (peso seco) en los cultivos expuestos a <0.1 y 1000 mg As^(V) L⁻¹

respectivamente, y concentración de fósforo equivalente al medio f/10 (1.13 mg L⁻¹). Los resultados de los análisis de especiación de As, indicaron que la especie predominante fue As^(V). Sin embargo, se observaron concentraciones más elevadas en las células cosechadas el día 4 de cultivo (7120 µg g⁻¹ a 10 mg As^(V) L⁻¹ en medio f/10 y 27800 µg g⁻¹ a 1000 mg As^(V) L⁻¹ en medio f/20) en comparación con las células cosechadas el día 8 del periodo de cultivo (2200 µg g⁻¹ a 10 mg As^(V) L⁻¹ en medio f/20 y 10250 µg g⁻¹ a 1000 mg As^(V) L⁻¹ en medio f/10). Las menores concentraciones de As^(V) en la microalga se observaron en medio de cultivo con tratamiento de fósforo equivalente al medio f/2 (5.65 mg L⁻¹) para todas las concentraciones de arsenato evaluadas. Se ha demostrado que la incorporación de As desde el medio ocurre rápidamente, siendo tomado y transformado dentro de 48 a 96 h de la adición de arsenato al medio de cultivo (Sanders y Windom 1980). Por otro lado, gran parte del arsénico inorgánico y compuestos metilados de As pudiesen ser liberados al medio en condiciones de excesiva absorción de arsenato como mecanismo de detoxificación de las células hacia el final del período de cultivo. La mayoría de los microorganismos, cuando se encuentran con metales pesados, responden mediante la producción de péptidos ligando-metálicos, como las fitoquelatinas (PCs) y metalotioneinas (MTs). Estos péptidos ricos en grupos tiol (-SH), se unen a una variedad de metales pesados y reducen su toxicidad por secuestro (Cobbett & Goldsbrough 2002). Muchos microorganismos han desarrollado vías de resistencia natural para metales pesados, que están estrechamente controladas por una proteína metaloreguladora específica. Recientemente, Singh *et al.* (2008) reportó la utilidad de una MT de un alga marina (*Fucus vesiculosus*) tolerante al As. La alta afinidad y selectividad natural de estas proteínas metaloreguladoras han sido explotadas para la acumulación específica de mercurio y arsénico en bacterias (Bae *et al.* 2003; Kostal *et al.* 2004). Un enfoque exitoso es aprovechar la evolución natural de unión metal-MTs, de metales y metaloides específicos desde sitios contaminados, ya que se ha demostrado que algunos metaloides, tales como As y Se aumentan la producción de fitoquelatinas, pero con menor actividad que los metales pesados como el Cd²⁺ (el activador más fuerte), Pb²⁺, Zn²⁺ y Cu²⁺ entre otros (Grill *et al.*, 1987). Se determinó además que tratamientos con calor, frío, radiación ultravioleta (UV), hormonas, la anoxia o el estrés oxidativo no inducen la síntesis de fitoquelatinas (Steffens 1990). Adicionalmente, la inducción de PCs en microalgas como una respuesta a la exposición a As^(V), confirma la unión de As a grupos tiol como el glutatión y fitoquelatinas (Pawlik-Skowronska *et al.* 2004; Morelli *et al.* 2005).

En menor proporción se detectó la presencia de DMA^(V) y tres tipos de arsenoazúcares (Tabla III y IV), encontrándose concentraciones más elevadas de estos compuestos en las células cosechadas al término del periodo de cultivo (3 – 45 µg g⁻¹ a 10 mg As^(V) L⁻¹ y 8 - 70 µg g⁻¹ a 1000 mg As^(V) L⁻¹). Los diferentes rangos de fosfato evaluados en el medio de cultivo no influyeron en la concentración de estas especies de As. Sanders y Windom (1980), reportaron información sobre la proporción de arsénico inorgánico/orgánico presentes en las microalgas, bajo el supuesto de que las especies de As orgánico comprenden simples compuestos metilados como MMA y DMA. Sin embargo, en base a la digestión de extractos acuosos de algas marinas se indicó la presencia de especies de As más complejas (Andreae & Klumpp 1979). Previamente se ha sugerido (Edmonds & Francesconi 1987) que la formación de arsenoazúcares en las algas marinas es una continuación de la metilación del As inorgánico. La producción de arsenoazúcares comienza con DMA^(V) retenido en las células algales, que luego se

reducirá a DMA^(III) y posteriormente será oxidado por la adición del grupo adenosil de la S-adenosilmetionina (SAM), a continuación este nucleósido se somete a glicosidación para producir una gama de arsenoazúcares. La formación de arsenoazúcares ha sido detectada previamente en la diatomea *Chaetoceros concavicornis* (Edmonds *et al.* 1997), en el alga de agua dulce *Chlorella vulgaris* (Murray *et al.* 2003), *Chlorella sp.* (Levy *et al.* 2005), *Monoraphidium arcuatum* (Levy *et al.* 2005) y en la microalga verde *Dunaliella tertiolecta* y diatomea *Phaeodactylum tricorpnutum* (Foster *et al.* 2008); sin embargo, la formación de arsenoazúcares en todas las clases de microalgas marinas y de agua dulce como un importante mecanismo del metabolismo del As no se ha establecido.

En cuanto a la formación de arsenolípidos en *N. epithemioides* observamos una disminución de estos en los tratamientos con menor cantidad de fósforo. Nuestros resultados indican que la especie dominante de lípidos de As, corresponde a fosfolípidos del tipo OH-ribosa (Fig. 5). Las concentraciones más elevadas de OH-ribosa en los lípidos de las células se encontraron en los cultivos incubados en medio f/2 (490 $\mu\text{g g}^{-1}$ a 10 mg As^(V) L⁻¹ y 940 $\mu\text{g g}^{-1}$ a 1000 mg As^(V) L⁻¹). Sin embargo, la falta de técnicas adecuadas para la determinación de lípidos de arsénico ha dificultado la identificación de arsenolípidos en las microalgas. Por lo que, la detección e identificación de lípidos de As ocurre principalmente en macroalgas marinas y animales marinos o productos de origen animal (Morita & Shibata 1988; Hanaoka *et al.* 1999, 2001; Devalla & Feldmann 2003; Kohlmeyer *et al.* 2005; Schmeisser *et al.* 2005). La detección de lípidos de arsénico en microalgas ha sido previamente reportada para diatomea *P. tricorpnutum* y *Chaetoceros sp.* (Reitan *et al.* 1994), la microalga verde *Nannochloris atomus* y *Tetraselmis sp.*, la microalga verde *Dunaliella tertiolecta* y la diatomea *Phaeodactylum tricorpnutum* (Foster *et al.* 2008).

Finalmente, este estudio contribuye al avance en la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías y metodologías de remoción de arsénico en el agua y ecosistemas acuáticos. Estudios de biorremediación de metales traza utilizando organismos no manipulados genéticamente y que naturalmente por las características particulares de su entorno han desarrollado varias estrategias para la detoxificación de metales y metaloides como el arsénico, ha sido poco estudiado. La diatomea bentónica *Nitzschia epithemioies* aislada desde laguna Huasco, altiplano norte de Chile, presenta un alto potencial biológico para la remoción de arsénico en aguas contaminadas con el metaloide, y constituye una alternativa tecnológica de bajo costo el costo, amigable con el medio ambiente y viable técnicamente a corto plazo.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, el siguiente paso a seguir en la línea de investigación sería evaluar en una primera etapa a nivel de microescala el potencial real de biorremoción de arsénico inorgánico por *N. epithemioies*, a través del cultivo en un biorreactor continuo con agua o efluente realmente contaminado con arsénico. Para en una segunda etapa, utilizar efectivamente la microalga como organismo remediador de aguas con alto contenido de sales y arsénico en cultivos masivos.

CONCLUSIONES

1. Considerando todos los resultados obtenidos para esta investigación de tesis fue posible aprobar la hipótesis de que diatomeas bentónicas del salar del Huaco, Altiplano norte de Chile, con altas concentraciones de arsénico de origen natural poseen una alta capacidad para bioconcentrar y biotransformar el arsénico inorgánico, principalmente en *Nitzschia epithemioides*.
2. Las especies de diatomeas en estudio poseen diferentes capacidades para tolerar el arsénico a pesar de ser aisladas en un entorno común con las mismas variables físicas y químicas del ambiente.
3. *Nitzschia epithemioides* y *Nitzschia* sp, presentaron altas tasas de crecimiento exponencial, altas densidades celulares y capacidad de tolerar diferentes condiciones de temperatura, densidad de flujo fotónico y concentración de silicatos y selenio en el medio de cultivo.
4. *N. epithemioides* presentó una gran capacidad de tolerar elevadas concentraciones de arsénico inorgánico. La concentración total de As más elevada al final del periodo de cultivo, fue de 115 a 10480 $\mu\text{g g}^{-1}$ (peso seco) en los cultivos expuestos a <0.1 y $1000 \text{ mg As}^{(\text{V})} \text{ L}^{-1}$ respectivamente, y concentración de fósforo equivalente al medio f/10. Los resultados de los análisis de especiación de As, indicaron que en promedio la especie predominante fue $\text{As}^{(\text{V})}$ (76 %), seguido por arsenolípidos del tipo OH-ribosa (23 %), una menor proporción de tres tipos de arsenoazúcares (1.27%) y $\text{DMA}^{(\text{V})}$ (0,06%).
5. La diatomea bentónica *Nitzschia epithemioides*, posee un alto potencial biológico para la remoción de arsénico en aguas y ecosistemas acuáticos contaminadas con el metaloide, y constituye una alternativa tecnológica de bajo costo, amigable con el medio ambiente y que podría ser viable técnicamente a corto plazo.

REFERENCIAS

- Anderson LCD, Bruland KW. 1991. Biochemistry of arsenic in natural water: the importance of methylated species. *Environ Sci Technol.* 25, 420-427.
- Andreae, M.O., Klumpp, D., 1979. Biosynthesis and release of organoarsenic compounds by marine algae. *Environ. Sci. Technol.* 13 (6), 738–741.
- Bae W, Wu C, Kostal J, Mulchandani A, Chen W. 2003. Enhanced mercury biosorption by bacterial cells with surface-displayed MerR. *Appl Environ Microbiol.* 69, 3176-3180.
- Bard S.M. 1999. Global transport of anthropogenic contaminants and the consequences for Arctic marine ecosystems. *Marine Pollution Bulletin* 38(5): 356-379.
- BEST (Board on Environmental Studies and Toxicology). 2001. Arsenic in drinking water: 2001 update. National Academy Press, Washington D.C., 225 pp. <http://www.nap.edu/books/0309076293/html>.
- Bhattacharya R, Chatterjee D, Nath B, Jana J, Jacks G, Vahter M. 2003. High arsenic groundwater: Mobilization, metabolism and mitigation - an overview in the Bengal Delta Plain. *Molec. Cell. Biochem.*, 253(1-2), 347-355.
- Brookins D.G. 1988. Eh-pH Diagrams for Geochemistry. Springer-Verlag, Berlin. C.R. (Eds.), *Arsenic Exposure and Health*, 91 .100. Science and Technology Letters, Northwood.
- Cervantes C, Ji G, Ramirez J.L, Silver S. 1994. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 355-367.
- Cobbett C, Goldsbrough P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol.* 53, 159-182.
- Cullen W.R, Harrison L.G, Li H, Hewitt G. 1994. Bioaccumulation and excretion of arsenic compounds by a marine unicellular alga, *Polyphusa peniculus*. *Appl. Organomet. Chem.* 8, 313-324.
- Dawson D.C, Ballatori N. 1995. Membrane transporters as sites of action and routes of toxic metals. In: Goyer RA and Cherian G (ed) *Toxicology of Metals*. Springer-Verlag. Berlin. pp 53-76.
- Devalla S, Feldmann J. 2003. Determination of lipid-soluble arsenic species in seaweed-eating sheep from Orkney. *Appl. Organomet. Chem.* 17, 906-912.
- Di Toro, D.M, Allen H.E, Bergman H.L, Meyer J.S, Paquin P.R, Santore R.C. 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 20, 10, p. 2383-2396.

Dorador, C.R., R. Pardo & I. Vila. 2003. Variaciones temporales de parámetros físicos, químicos y biológicos de un lago de altura: el caso del lago Chungara. *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 15–22.

Edmonds J.S, Francesconi K.A. 1987. Transformations of arsenic in the marine environment. *Experientia*. 43, 553-557.

Edmonds J.S, Shibata Y, Francesconi K.A, Rippington R.J, Morita M. 1997. Arsenic transformations in short marine food chains studies by HPLC-ICP-MS. *Appl. Organomet. Chem.* 11, 281-287.

Fernández-Turiel J. L, Garcia-Valles M, Gimeno-Torrente D, Saavedra-Alonso J, Martinez Manent S. 2005. The hot spring and geyser sinters of El Tatio, Northern Chile. *Sed. Geol.*, 180, 125-147.

Foster S., Thomson D., Maher W. 2008. Uptake and metabolism of arsenate by anoxic cultures of the microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Chemistry* 108: 172-183.

GESAMP (IMO/FAO/UNESCO/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution). 1986. Review of potentially harmful substances – arsenic, mercury and selenium. Reports and Studies No. 28. 73 pp.

Gobas F.A.P.C, Wilcockson J.B, Russell R.W, and Haffner G.D. 1999. Mechanisms of biomagnification in fish under laboratory and field conditions. *Environmental Science and Technology* 33(1): 133-141.

Gorby M.S. 1994. Arsenic in human medicine. In: Nriagu, J.O. (Ed.), *Arsenic in the Environment, Part II, Human Health and Ecosystem Effects*. Wiley Series in Advances in Environmental Science and Technology 27. Wiley, New York, pp. 1–6

Guo X, Fujino Y, Kaneko S, Wu K, Xia Y, Yoshimura T. 2001. Arsenic contamination of groundwater and prevalence of arsenical dermatosis in the Hetao plain area, Inner Mongolia, China. *Mol. Cell. Biochem.* 222,137-140.

Gurzau, E.S, Gurzau, A.E. 2001. Arsenic in drinking water from groundwater in transylvania, Romania. In: Chapell, W.R., Abernathy, C.O., Calderon, R.L. (Eds.). *Arsenic Exposure and Health Effects IV*. Elsevier, Amsterdam, pp. 181-184.

Grill E, Winnacker E.L, Zenk M.H. 1987. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 439-443.

Hanaoka K, Goessler W, Yoshida K, Fujitaka Y, Kaise T, Irgolic K.J. 1999. Arsenocholine and dimethylated arsenic-containing lipids in star-spotted shark *Mustelus manazo*. *Appl. Organomet. Chem.* 13, 765-770.

Hanaoka K, Tanaka A, Nagata Y, Yoshida K, Kaise T. 2001. Water-soluble arsenic residues from several arsenolipids occurring in the tissues of the starspotted shark *Musterus manazo*. Appl. Organomet. Chem. 15, 299-305.

Hargrave B.T, Phillips G.A, Vass W.P, Bruecker P, Welch H.E, and Siferd T.D. 2000. Seasonality in bioaccumulation of organochlorines in lower trophic level Arctic marine biota. Environmental Science and Technology 34(6): 980-987.

Hasegawa H., Matsui M., Okamura S., Hojo M., Iwasaki N., Sohrin Y. 1999. Arsenic speciation including 'hidden' arsenic in natural waters. Applied Organometal.Chem.,13, 113 -119.

Hayteas D.L, and Duffield D.A. 2000. High levels of PCB and *p,p'*-DDE found in the blubber of killer whales (*Orcinus orca*). Marine Pollution Bulletin 40(6): 558-561.

IPCS/WHO (International Programme on Chemical Safety / World Health Organization). 1992. Inorganic arsenic compounds other than arsine. Health and Safety Guide No. 70. 31 pp.

Jarman W.M, Norstrom R.J, Muir D.C.G, Rosenberg B, Simon M, and Baird R.W. 1996. Levels of organochlorine compounds including PCDDS and PCDFS, in the blubber of Cetaceans from the west coast of North America. Marine Pollution Bulletin 32(5): 426- 436.

Kohlmeyer U, Jakubik S, Kuballa J, Jantzen E. 2005. Determination of arsenic species in fish oil after acid digestion. Microchim. Acta 151, 249-255.

Konasewich D.E, Chapman P.M, Gerencher E, Vigers G, and Treloar N. 1982. Effects, pathways, processes, and transformation of Puget Sound contaminants of concern. NOAA technical memorandum OMPA-20. 357 pp.

Kostal J, Yang R, Wu C.H, Mulchandani A, Chen W. 2004. Enhanced arsenic accumulation in engineered bacterial cells expressing ArsR. Appl Environ Microbiol. 70, 4582-4587.

Lee B.G, Grimscom S.B, Lee J.S, Choi H.J, Koh C.H, Luoma S.N, and Fisher N.S. 2000. Influences of dietary uptake and reactive sulfides on metal bioavailability from aquatic sediments. Science 287: 282-284.

Léonard A. 1991. Arsenic. In: Merian, E. (Ed.): Metals and their Compounds in the Environment – Occurrence, Analysis, and Biological Relevance. VCH, Weinheim.

Levy J.L, Stauber J.L, Adams M, Maher W.A, Kirby J, Jolley D. 2005. Toxicity, biotransformation and mode de action of arsenic in two freshwater microalgae (*Chlorella* sp. And *Monoraphidium arcuatum*). Environ. Toxicol. Chem. 24 (10), 2630-2639.

Magos L. 1990. Marine health hazards of anthropogenic and natural origin. Annex X. p. 447-507. In: UNEP: Technical annexes to the report on the state of the marine environment. UNEP Regional Seas Reports and Studies No. 114/2.

Malins D.C, McCain B.B, Brown D.W, Sparks A.K, Hodgins H.O, and Chan S.L. 1982. Chemical contaminants and abnormalities in fish and invertebrates from the Puget Sound NOAA Technical Memorandum OMPA-19. 168 pp

Markert B. 1998. Distribution and biogeochemistry of inorganic Chemical in the environment. In: Schüürmann G and Markert B. Ecotoxic. John Wiley & Sons. New York. pp 165-222.

Márquez-García, M., I. Vila, L.F. Hinojosa, M.A. Méndez, J.L. Carvajal & M.C. Sabando. 2009. Distribution and seasonal fluctuations in the aquatic biodiversity of the southern Altiplano. *Limnologica* 39: 314-318.

Matschullat J. 2000. Arsenic in the geosphere – a review. *Sci.Total Environ.* 249, 297–312.

Meharg A.A, Hanley-Whilaker J. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic-resistant and nonresistant plant species. *New Phytol* 154:29-43.

Merrifield M.E, Ngu T, Stillman M.J. 2004. Arsenic binding to *Fucus vesiculosus* metallothionein. *Biochem Biophys Res Commun.* 324, 127-132.

Morelli E, Mascherpa M.C, Scarano G. 2005. Biosynthesis of phytochelatin and arsenic accumulation in the marine microalga *P. Tricornutum* in response to arsenate exposure. *BioMetals.* 18, 587-593.

Morita M, Shibata Y. 1988. Isolation and identification of arsenolipid from a brown alga, *Undaria pinnatifida* (Wakame). *Chemosphere* 17, 1147-1152.

Morrison H.A, Gobas F.A.P.C, Lazar R, and Haffner G.D. 1996. Development and verification of a bioaccumulation model for organic contaminants in benthic invertebrates. *Environmental Science and Technology* 30(11): 3377-3384.

Murray L.A, Raab A, Marr I.L, Feldmann J. 2003. Biotransformation of arsenate to arsenosugars by *Chlorella vulgaris*. *Appl. Organomet. Chem.* 17, 669-674.

McArthur J. M, Ravenscroft P, Safiulla S, Thirlwall M. F. 2001. Arsenic in groundwater: Testing pollution mechanisms for sedimentary aquifers in Bangladesh. *Water Resour.Res.* 37, 109–118.

Nakata H, Kannan K, Jing L, Thomas N, Tanabe S, and Giesy J.P. 1998. Accumulation pattern of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in southern sea otters (*Enhydra lutris neries*) found stranded along the coast of California, USA. *Environmental Pollution* 103: 45-53.

Oremland R.S, Stolz J.F, Hollibaugh J.T. 2004. The microbial arsenic cycle in Mono Lake, California. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 48(1), 15-27.

Oremland R.S, Stolz J.F. 2005. Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends Microbiol.*, 13(2), 45-49.

Pawlik-Skowronska B, Pirszel J, Kalinowska R, Skrowronski T. 2004. Arsenic availability and direct role of GSH and phytochelatins in As detoxification in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Aquat. Toxicol.* 70, 201-212.

Perales-Vela H.V, Peña-Castro J.M, Cañizares-Villanueva R.O. 2006. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere.* 64, 1-10.

Planas, D., Healey, F.P., 1978. Effects of arsenate on growth and phosphorus metabolism of phytoplankton. *J. Phycol.* 14, 337-341.

Queirolo F, Stegen S, Restovic M, Paz M, Ostapczuk P, Schwuger M.J, Munoz L. 2000a. Total arsenic, lead, and cadmium levels in vegetables cultivated at the Andean villages of northern Chile. *Sci. Tot. Environ.*, 255(1-3), 75-84.

Queirolo F, Stegen S, Mondaca J, Cortes R, Rojas R, Contreras C, Munoz L, Schwuger M.J, Ostapczuk P. 2000b. Total arsenic, lead, cadmium, copper, and zinc in some salt rivers in the northern Andes of Antofagasta, Chile. *Sci. Tot. Environ.*, 255(1-3), 85-95.

Rahman M.M, Chowdhury U.K, Mukherjee S.C, Mondaj B.K, Paul K, Lodh D, Biswas B.K, Chanda C.R, Basu GK, Saha K.C, Roy S, Das R, Palit S.K, Quamruzzaman Q, Chakraborti D. 2001. Chronic arsenic toxicity in Bangladesh and West Bengal, India-a review and commentary. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 39, 683-700.

Reitan K.I., Rainuzzo J.R., Olsen, Y. 1994. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J. Phycol.* 30, 972-979.

Rüde T.R. 1996. Beiträge zur Geochemie des Arsens. *Karlsruher Geochemische Hefte, Schriftenreihe des Instituts für Petrographie und Geochemie, Band 10, Universität Karlsruhe.*

Rodríguez R, Ramos J.A, Armienta A. 2004. Groundwater arsenic variations: the role of local geology and rainfall. *Appl. Geochem.*, 19(2), 245-250.

Sancha A.M, Frenz P. 2000. Estimate of the current exposure of the urban population of northern Chile to arsenic Interdisciplinary Perspectives on Drinking Water Risk Assessment and Management (Proceedings of the Santiago (Chile) Symposium, September 1998). IAHS Publ. no. 260, pp. 3-8.

Sanders J.G, Windom H.L. 1980. The uptake and reduction of arsenic species by marine algae. *Estuar. Coast. Mar. Sci.* 10, 555-567.

Singh S, Mulchandani A, Chen W. 2008. Highly selective and rapid arsenic removal by metabolically engineered *Escherichia coli* cells expressing *Fucus vesiculosus* metallothionein. *Appl Environ Microbiol.* 74, 2924-2927.

Schmeisser E, Goessler W, Kienzl N, Francesconi K.A. 2005. Direct measurement of lipid-soluble arsenic species in biological samples with HPLC-ICPMS. *Analyst* 130, 948-955.

Shin P.K.S, and Lam W.K.C. 2001. Development of a marine sediment pollution index. *Environmental Pollution.* 113: 281-291.

Smedley P.L, Kinniburgh D.G. 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem.*, 17(5), 517-568.

Smedley P.L, Nicolli H.B, Macdonald D.M.J, Barros A.J, Tullio J.O. 2002. Hydrogeochemistry of arsenic and other inorganic constituents in groundwaters from La Pampa, Argentina. *Appl. Geochem.*, 17(3),259-284.

Steffens J.C. 1990. The heavy metal-binding peptides of plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 553-575.

Stumm W, Morgan J.J. 1995. *Aquatic Chemistry*. John Wiley & Sons. Nueva York. 1022 pp.

Umweltbundesamt. 1983. *Umwelt- und Gesundheitskriterien für Arsen*. Bericht 4/83. Erich Schmidt, Berlin, 1983.

Vargas, C., P. Acuna & I. Vila. 2004. Relación entre la calidad del agua y la biota en la cuenca Salar de Huasco. In: A. Fernández & V. Sánchez (eds.), *El agua en Iberoamérica: Experiencias en gestión y valoración del agua*, CYTED-XVII, pp. 145–152. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Buenos Aires.

Williams L.G, and Krueger C. 1988. Health risk assessment of chemical contaminants in Puget Sound seafood Tetra Tech, Inc., Bellevue, WA. TC-3338-28 Final Report. 704 pp.

Wilken R.D. 1998. Speciation of Chemicals elements in the environment. In: Schüürmann G, Markert B. *Ecotoxic*. Wiley. New York. pp 223-235.

Yan X, Kerrich P. R, Hendry M.J. 2000. Distribution of arsenic(III),arsenic(V)and total inorganic arsenic in pore-waters from a thick till and clay-rich aquitard sequence, Saskatchewan, Canada. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 64, 2637 -2648.



