

Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae)

Jiudith Cordero¹, Miguel Guevara¹, Ever Morales² & César Lodeiros^{1*}

¹ Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná 6101, Venezuela

² Departamento de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela

*Autor de correspondencia: Tel.: 093 302118; Tel./fax: 315902; clodeiro@sucre.udo.edu.ve.ve

Recibido 03-IX-2001. Corregido 11-II-2004. Aceptado 18-VII-2005.

Abstract: Effect of heavy metals on the growth of the tropical microalga *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae).

We determined the toxic effect of four metals, cadmium (Cd), copper (Cu), mercury (Hg) and lead (Pb), on the tropical microalga *Tetraselmis Chuii* (Butcher, 1959). We exposed 50 ml of cultivated microalgae (f/2 Guillard) in the exponential growth phase, with three replicates, to concentrations of 0 (control), 0.1, 1.0, 5.0, 10.0 and 20.0 mg·l⁻¹ with each metal for 96 hr. We evaluated the lethal effect daily, through the cellular count. In the control treatment (not exposed to any metal) we observed an increase in cellular density. In all treatments exposed to metals, we observed a decrease in cellular density, which accelerated in 48 h, after which it became less pronounced. There were exceptions with low concentrations of Cd and Cu at 24 h, as there was no significant decrease, probably due to their use as micronutrients at these low concentrations. The metal that caused the most lethal effect was Pb, which killed 50% of the microalgal population at a concentration of 0.40 mg·l⁻¹. This concentration was 3 times lower than that of mercury and 13 times lower than those of cadmium and copper. The microalga *Tetraselmis chuii* is recommended as a model species to estimate the toxic effects of xenobiotics on tropical seawater environments. Rev. Biol. Trop. 53(3-4): 325-330. Epub 2005 Oct 3.

Key words: Heavy metals, contamination, *Tetraselmis chuii*, toxicity, phytoplankton.

El medio acuático y en especial el marino es uno de los ambientes más expuestos a los contaminantes, debido a que las descargas, sean por vía terrestre, acuático-terrestre o atmosférica, tienen como receptáculo final el ambiente marino (Acuña-Gonzalez *et al.* 2004, Coll *et al.* 2004, García-Céspedes *et al.* 2004, Sponberg 2004a,b,c, Norville 2005, Rojas de Astudillo *et al.* 2005). En estos sistemas las microalgas constituyen el principal componente del fitoplancton que soporta la cadena trófica, de esta manera, un cambio, sea cualitativo o cuantitativo, producido por un contaminante, podría repercutir drásticamente en el ecosistema (Nalewajko y Olavenson 1998, Franklin *et al.* 2000).

A concentraciones bajas, muchos de los metales juegan un papel esencial en el

metabolismo de las microalgas, tal es el caso de los metales Zn y Cu (Tadros *et al.* 1990); sin embargo, cuando las concentraciones son altas, dan origen a condiciones de contaminación del medio que provocan desbalances metabólicos en el fitoplancton (Rodríguez y Rivera 1995). Por ejemplo, cuando el fitoplancton es expuesto a concentraciones elevadas de metales pesados, se produce una inhibición del crecimiento, así como cambios morfológicos, generados como una respuesta fisiológica a la exposición del metal que tienen como consecuencia una menor capacidad de respuesta de las poblaciones al ambiente (Rand y Petrocelli 1985, Walsh *et al.* 1987, Visviki y Rachlin 1994).

Algunas microalgas de zonas templadas han sido consideradas como especies modelos

para estudiar efectos de contaminación, debido a su sensibilidad ante diversos materiales de prueba; además de ser conocido sus requerimientos nutricionales, de poseer una alta tasa de crecimiento y de ser cultivadas fácilmente en el laboratorio (Couture *et al.* 1985, Nalewajko y Olavenson 1998). No obstante, pocas especies tropicales han sido estudiadas.

El presente trabajo evalúa el efecto tóxico de diversos metales sobre la especie *Tetraselmis chuii*, una microalga prasinofícea, de forma cilíndrica, de unos 8 a 16 μm de longitud y que debido a su gran distribución en los ecosistemas tropicales y amplia utilización en cultivos de laboratorios, le confiere una importancia notable como una posible especie modelo para estimar el impacto ambiental producido por xenobióticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El efecto del cadmio (CdCl_2 , 81% de pureza), cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 99% de pureza), mercurio (HgCl_2 , 99.55% de pureza) y plomo (PbCl_2 , 99% de pureza) sobre cultivos, en fase logarítmica, de la microalga *Tetraselmis chuii* (Butcher 1959), proveniente del cepario del Lab. Acuicultura, extensión Plancton, Instituto Oceanográfico de Venezuela, de la Universidad de Oriente, se evaluó a las concentraciones de 0.0 (control); 0.1; 1.0; 5.0; 10.0; y 20.0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ para cada metal.

El bioensayo comenzó a partir de la inoculación de 30 000 células $\cdot\text{ml}^{-1}$ de la microalga en 800 ml del cultivo f/2 de Guillard (utilizando agua de mar proveniente de la zona de Turpialito, Golfo de Cariaco, Venezuela, excenta de focos contaminantes), contenidos en matraces de 1 l y por triplicado. Cuando los cultivos alcanzaron la fase logarítmica a una densidad celular aproximada de 1.50×10^6 células $\cdot\text{ml}^{-1}$, a cada cultivo se le extrajo una alícuota de 50 ml, la cual se depositó en un matraz de 100 ml para cada concentración de cada metal analizado. Todo el bioensayo fue controlado en cuanto a temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), iluminación continua (2000 lux), salinidad (36‰), estableciendo una agitación manual diaria.

La densidad celular fue determinada mediante el recuento de las microalgas utilizando una cámara de Neubauer, a partir de muestras de un ml, tomadas diariamente hasta 96 h. En dicho recuento, no se cuantificaron células no pigmentadas o lisadas, considerándose éstas como células muertas. En función de minimizar el error generado por la variabilidad del número celular de las réplicas, la evaluación se estableció transformando los datos en porcentaje de incremento o decremento celular con respecto a la densidad inicial de cada réplica. Un análisis de varianza de una vía, previa transformación de los datos a arcoseno, en función de normalizar los datos (Zar 1984), fue aplicado, para determinar diferencias significativas ($P < 0.05$) de la densidad microalgal entre los metales en cada concentración e intervalo de tiempo analizado. En aquellos casos donde existieron diferencias significativas ($P < 0.05$), se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Scheffé. De igual manera, un análisis similar se aplicó para cada metal, en función de determinar diferencias entre los recuentos establecidos diariamente.

Por otra parte, el efecto de cada metal se analizó mediante la evaluación de la concentración letal del 50% de la población del cultivo (CL_{50}), utilizando un programa computarizado (Stephan 1977) siguiendo los protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas (Esclapés 1999). Los métodos binominal, probit, promedio móvil y logit fueron evaluados y se escogió el de mejor ajuste (probit).

RESULTADOS

En general, mientras se evidenció un crecimiento de los cultivos de la microalga sin exposición a metales (control), se observó una significativa ($P < 0.05$) disminución de la densidad algal en cada uno de los tratamientos con exposición a los metales, con excepción de los cultivos expuestos a 0.1 y 1.0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Cd y Cu, a las 24 hr, donde la disminución de la densidad algal fue no significativa ($P > 0.05$) con respecto a la inicial (Fig. 1). Un caso similar

ocurrió con el Hg, pero sólo a la concentración de 0.1 mg·l⁻¹.

Todos los metales ensayados produjeron una tendencia de decrecimiento acelerado hasta las 48 hr, evidenciándose una letalidad cercana al 50%, para todos los tratamientos a partir de

5 mg·l⁻¹ (Fig. 1). Esta letalidad fue menos pronunciada después de las 48 hr.

La concentración letal al 50% de la población microalgal (CL₅₀) fue mayor para las microalgas expuestas al Pb, con una relación de efecto letal de Pb > Hg > Cd > Cu, donde la concentración

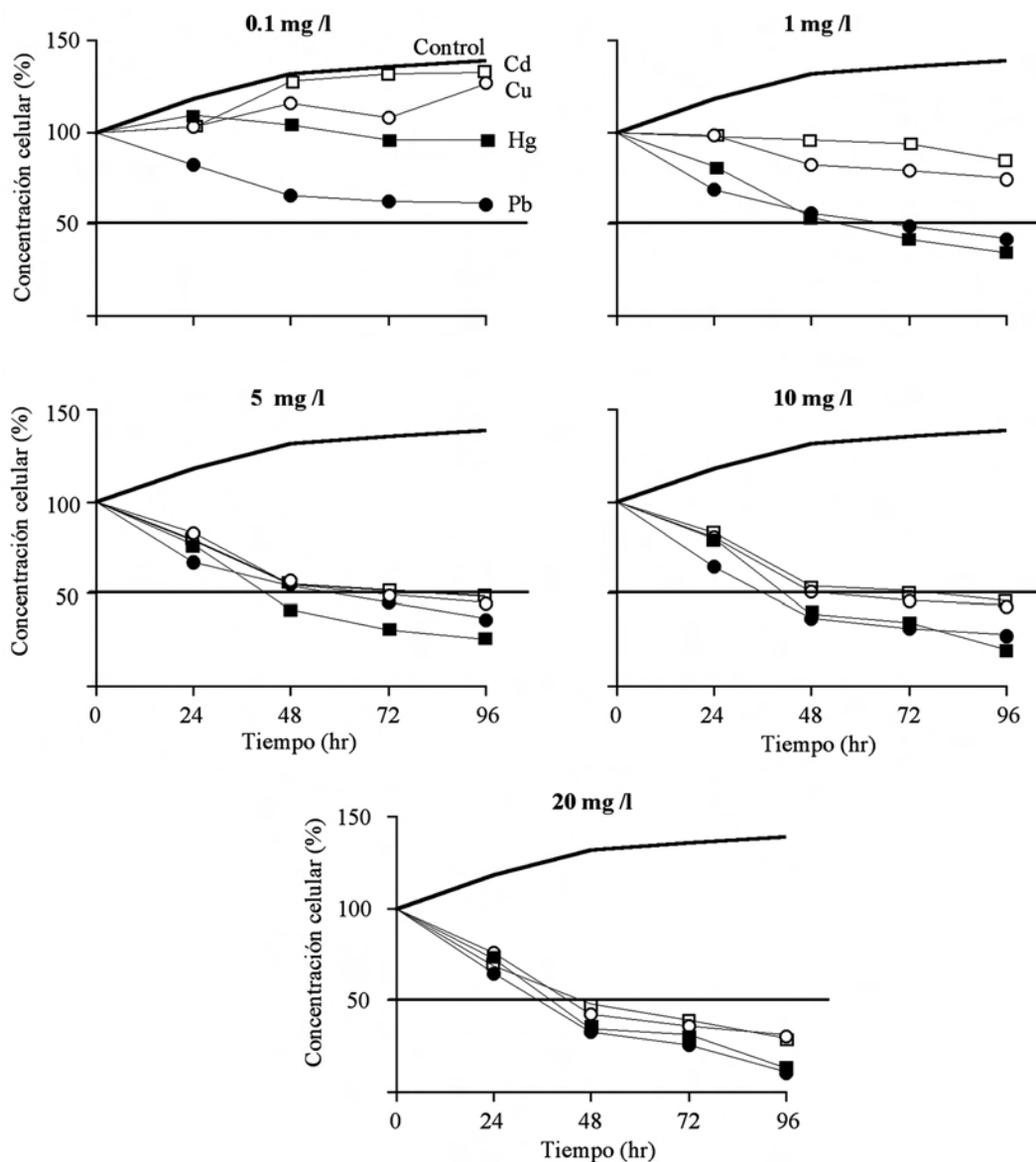


Fig. 1. Efecto del Cd (□), Cu (○), Hg (■) y Pb (●) a las concentraciones de 0.1; 1; 5; 10 y 20 mg/l sobre cultivos en fase logarítmica de la microalga *Tetraselmis chuii*.

Fig.1. Effect of Cd, Cu, Hg y Pb to the concentration of 0.1; 1; 5; 10 y 20 mg/l on logaritmic phase culture of microalgae *Tetraselmis chuii*.

del Pb ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) fue casi 3 veces menor que la establecida para el Hg ($1.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y más de 13 veces menor que la del Cd ($5.4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y Cu ($6.4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) (Cuadro 1).

DISCUSIÓN

Todos los metales ensayados a las diferentes concentraciones tuvieron un efecto letal en la microalga *Tetraselmis chuii*, a excepción del tratamiento con exposición al Cu y el Cd a la concentración menor ensayada ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), los cuales si bien proporcionaron densidades celulares menores al control (sin exposición al metal), produjeron, una mayor densidad celular que la inicial del bioensayo, sugiriendo una activa división celular. Este comportamiento, puede estar relacionado con la utilización del Cu como micronutriente (Rodríguez y Rivera 1995). En el caso del Cd, aunque este metal no ha sido establecido como micronutriente, estudios recientes (Cullen *et al.* 1999, Sunda y Huntsman 2000) han considerado que puede actuar como tal cuando se encuentra en concentraciones trazas y existe limitación de algunos micronutriente esenciales; situación que probablemente fue establecida en los cultivos ensayados, ya que el bioensayo se estableció con cultivos en una fase logarítmica avanzada, donde gran parte de los elementos trazas del medio de cultivo, probablemente se encontraban consumidos. Estos resultados, con respecto al Cd, son acordes con Romero (1999), quien en un estudio realizado con *Tetraselmis sp.* y *Chaetoceros sp.* encontró que la disminución

del crecimiento poblacional de estas microalgas ante el Cd se manifiesta a partir de concentraciones superiores a $4.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Con la excepción del Cu y Cd y en concentraciones superiores a $0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, se observó un decrecimiento acelerado hasta las 48 hr, a partir de cuando la proporción de letalidad se hace menos pronunciada, posiblemente, debido a adaptaciones de las células como producto de la bioacumulación de los metales a través de procesos antitóxicos. En este sentido, es importante señalar, que se observó una tendencia del aumento del volumen celular a medida que transcurría el tiempo de exposición y concentración de los metales (datos no mostrados). Observaciones similares fueron informadas por Rereiz *et al.* (1994) en cultivos de la diatomea *Phaeodactylum tricorutum* expuestos a diferentes concentraciones de Cu. Estudios sobre la fisiología y ultraestructura de la microalga con la determinación de procesos enzimáticos de síntesis de proteínas relativas a procesos antitóxicos, tipo metalotioninas, son necesarios para dilucidar dicha hipótesis.

El metal que produjo mayor efecto fue el Pb, seguido del Hg, con los cuales se obtuvieron una concentración letal al 50% de la población en los cultivos de *Tetraselmis chuii*, muy superior a las ejercidas por el Cu y el Cd. Esto corrobora la mayor letalidad del Pb y Hg, dos metales no esenciales para el crecimiento microalgal.

Aunque la mayoría de los estudios de efectos tóxicos agudos en organismos acuáticos se realizan como una respuesta a períodos de 96 hr (Esclapés 1999), la condición de reproducción rápida de las microalgas y el

CUADRO 1
Concentración letal al 50% de los metales Cd, Cu, Hg y Pb en la microalga *Tetraselmis chuii*

TABLE 1
Lethal concentration at 50% of the heavy metal Cd, Cu, Hg and Pb in the microalgae *Tetraselmis chuii*

Metal	CL ₅₀ (mg/l)	Intervalo de Confianza al 95%	
		Límite Inferior	Límite Superior
Cadmio	5.44	4.185	7.175
Cobre	6.44	5.133	8.324
Mercurio	1.14	0.053	4.582
Plomo	0.40	0.001	1.583

mayor efecto de los metales pesados de letalidad mostrada antes de las 48 hr, observada en el presente estudio, sugiere la reducción del tiempo de exposición de los metales en microalgas a 48 hr para un protocolo de efectos agudos. La implementación de dicha reducción del tiempo de evaluación, permitiría menos costos de la prueba y una más rápida evaluación, evitando la posible adaptación microalgal a los metales, lo cual pudiera enmascarar el efecto tóxico del xenobiotico.

Debido al carácter amplio en la utilización de actividades de cultivo en zonas tropicales de *Tetraselmis chuii*, y características deseables para establecer pruebas de toxicidad como su volumen celular, el cual permite fácilmente realizar monitoreos con cámaras de recuento celular, universalmente utilizadas, así como la sensibilidad ante metales pesados mostrada en el presente estudio, permiten recomendarla como una especie modelo para la utilización en pruebas para estimar efectos tóxicos por xenobióticos en ambientes marinos tropicales.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue parcialmente financiado por el Departamento de Biología Pesquera del Instituto Oceanográfico de Venezuela de la Universidad de Oriente y el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de Venezuela (FONACIT).

RESUMEN

El presente trabajo determina el efecto tóxico de los metales cadmio (Cd), cobre (Cu), mercurio (Hg) y plomo (Pb) en la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Butcher, 1959). Se expuso, por triplicado, 50 ml de cultivo (f/2 Guillard) de la microalga en fase de crecimiento logarítmica ante las concentraciones de 0 (control); 0.1; 1.0; 5.0; 10.0 y 20.0 mg·l⁻¹ durante 96 hr. La evaluación del efecto letal se realizó diariamente, mediante recuento celular con una cámara de Neubauer. En el tratamiento control, sin exposición al metal, se observó un incremento de la densidad celular, en contraste con un decrecimiento en los tratamientos con exposición a los metales, los cuales

fueron acelerados hasta las 48 hr, a partir de cuando el decrecimiento se hizo menos pronunciado. Una excepción se produjo con el Cd y el Cu a las 24 h, donde no se determinó decrecimiento significativo, probablemente debido a su capacidad de actuar como micronutriente a bajas concentraciones. El metal que produjo mayor efecto fue el Pb, produciendo una letalidad al 50% de la población microalgal a 0.40 mg·l⁻¹, la cual fue casi tres veces menor que la establecida para el Hg y más de 13 veces menor que la del Cd y Cu. Se recomienda la microalga *Tetraselmis chuii* como especie modelo para la utilización en pruebas en función de estimar efectos tóxicos por xenobióticos en el ambiente acuático marino tropical.

Palabras clave: metales pesados, contaminación, *Tetraselmis chuii*, toxicidad, fitoplancton.

REFERENCIAS

- Acuña-González, J., J.A. Vargas-Zamora, E. Gómez-Ramírez & Jairo García-Céspedes. 2004. Hidrocarburos de petróleo, disueltos y dispersos, en cuatro ambientes costeros de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52 (Suppl. 2): 43-50.
- Cullen, J., T. Lane, F. Morel & A. Sherrel. 1999. Modulation of Cd uptake in phytoplankton by seawater CO₂ concentration. *Nature* 402: 165-166.
- Couture, P., S. Visser, R. Vancoillie & C. Blaise. 1985. Algal bioassays their significance in monitoring water quality with respect to nutrients and toxicants. *Schweiz. Z. Hydrol.* 47: 127-158.
- Coll, M. & J. Cortés & D. Sauma. 2004. Características físico-químicas y determinación de plaguicidas en el agua de la laguna de Gandoca, Limón, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52(Suppl. 2): 33-42.
- Esclapés, M. 1999. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas y terrestres. Versión 2.0. Gerencia General de Tecnología, Departamento de Ecología y Ambiente. INTEVEP. Caracas. 215 p.
- Franklin, N., J. Stauber, S. Markich & R. Lim. 2000. pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical fresh water alga (*Chlorella* sp.). *Aquat. Toxicol.* 48: 275-289.
- García-Céspedes, J., J. Acuña-González & J.A. Vargas-Zamora. 2004. Metales traza en sedimentos costeros de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52(Suppl. 2): 51-60.
- Nalewajko, C. & M. Olavenson. 1998. Ecofisiological considerations in microalgal toxicity test, pp. 289-309. *In* P. Wells, K. Lee & Ch. Blaise (eds). *Microscale*

- testing in aquatic toxicity: advances, technical and practice. CRC, Boca Raton, Florida.
- Norville, W. 2005. Spatial distribution of heavy metals in sediments from the Gulf of Paria, Trinidad. *Rev. Biol. Trop.* 53(Suppl. 1): 33-40.
- Rand, G. & S. Petrocelli. 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology*. Hemisphere Corporation, Washington, D.C. 665 p.
- Reiriz, S., A. Cid, E. Torres, J. Abalde & C. Herrero. 1994. Different responses of the marine diatom *Phaodactylum tricorutum* to Koper toxicity. *Microbiología SEM* 10: 263-272.
- Rodríguez, L. & D. Rivera. 1995. Efecto del cobre y el cadmio en el crecimiento de *Tetraselmis suecica* (KYLIN) BUTCHER y *Dunaliella salina* TEODORESCO. *Estud. Oceanol.* 14: 61-74.
- Rojas de Astudillo, L., I. Chang Yen & I. Bekele. 2005. Heavy metals in sediments, mussels and oysters from Trinidad and Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 53(Suppl. 1): 33-40.
- Romero, Y. 1999. Efecto del cadmio sobre las microalgas *Tetraselmis* sp. y *Chaetoceros* sp. Tesis de Licenciatura. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 92 p.
- Spongberg, A.L. 2004a. PCB contamination in surface sediments in the coastal waters of Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52(Suppl. 2): 1-10.
- Spongberg, A.L. 2004b. PCB concentrations in sediments from the Gulf of Nicoya estuary, Pacific coast of Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52(Suppl. 2): 11-22.
- Spongberg, A.L. 2004c. PCB contamination in marine sediments from Golfo Dulce, Pacific coast of Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52(Suppl. 2): 23-32.
- Stephan, C.E. 1977. Methods for calculation an LC50. Pp. 65-84. *In* F.L. Mayer & J.L. Hamelink (eds). *Aquatic toxicology and hazaed evaluations*. ASTM-STP534. American Society for Testing Materials, Filadelfia, Pensilvania, EEUU.
- Sunda, W. & S. Huntsman. 2000. Effect of Zn, Mn and Fe on Cd accumulation in phytoplankton: Implications for oceanic Cd cyclin. *Limn. Oceanogr.* 45: 1501-1516.
- Tadros, M., P. Bulthia & W. Smith. 1990. Diferential response of marine diatoms to trace metal. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 826-831.
- Visviki, Y. & W. Rachlin. 1994. Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium: Effects on ultrastructure. *Archv. Environ. Contam. Toxicol.* 26: 1554-1562.
- Walsh, G., M. Yoder, L. Laughlin & E. Lores. 1987. Responses of marine unicellular algae to brominated organic compound in six growth media. *Ecotox. Envir. Safety* 14: 215-222.
- Zar, J. 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Nueva Jersey, EEUU. 699 p.