

SENSIBILIDAD AL CROMO: MICROBIOPRUEBAS CON LAS DIATOMEAS MARINAS *Isochrysis galbana* Parke Y *Chaetoceros gracilis* Schütt

SENSIBILITY TO CHROMIUM: MICROBIOASSAY WITH MARINE DIATOM *Isochrysis galbana* Parke AND *Chaetoceros gracilis* Schütt

Marianella Alayo¹, José Iannacone² y Anita Arrascue³

Resumen

En el Perú, las microalgas marinas *Isochrysis galbana* Parke y *Chaetoceros gracilis* Schütt, son utilizadas como alimentos de varias especies zoológicas de la cadena trófica marina; a su vez en condiciones de cultivo evita la utilización de la levadura de panificación, disminuyendo la acidificación del medio de cultivo y evitando así perjudicar a la acuicultura marina. El cromo es un contaminante de importancia antropogénica en el ecosistema acuático. En este trabajo se analiza el efecto del Cr⁺⁶ bajo la forma de K₂Cr₂O₇ en las microbiopruebas de ecotoxicidad de inhibición con las microalgas marinas, *I. galbana* y *C. gracilis* usando un estimador de crecimiento poblacional específico para cuantificar la respuesta de toxicidad. Se realizó el bioensayo teniendo como resultado el análisis de sensibilidad al K₂Cr₂O₇, productividad, costo-eficiencia y su aplicación potencial como una herramienta para el monitoreo ambiental de rutina. Los valores de Concentración de Inhibición media (CI₅₀) entre 24 h hasta 120 h para *I. galbana* fueron: 11.55 mg L⁻¹ (8.15 – 16.38) (24 h); 14.14 mg L⁻¹ (11.60 – 17.24) (48 h); 4.47 mg L⁻¹ (3.24 – 6.15) (72 h); 11.94 mg L⁻¹ (8.14- 17.49) (96 h) y 19.20 mg L⁻¹ (13.64- 27.26) (120 h). En cambio los valores de CI₅₀ entre 24 h hasta 120 h para *C. gracilis* fueron: 9.21 mg L⁻¹ (7.46 – 11.08) (24 h); 8.13 mg L⁻¹ (2.09 – 15.24) (48 h); 12.51 mg L⁻¹ (6.80 – 20.04) (72 h); 12.17 mg L⁻¹ (2.23- 34.32) (96 h) y 13.34 mg L⁻¹ (1.19- 77.61) (120 h). Los valores de pH y T° fueron evaluados a través de todo el bioensayo. Se compara la toxicidad del cromo con otras microbiopruebas acuáticas. Finalmente se analizan las perspectivas de empleo, en el Perú, de esta herramienta ecotoxicológica para la evaluación del riesgo ambiental del cromo.

Palabras claves: bioensayo, cromo, ecotoxicología, microalga marina.

Abstract

In Peru, marine microalgae *Isochrysis galbana* Parke and *Chaetoceros gracilis* Schütt, are employed as food source for many zoological species of the marine trophic chain. During culture conditions they prevent the use of yeasts, diminishing the acidification of culture media and in that way, avoiding injuries to the marine aquaculture. Chromium is a pollutant of anthropogenic importance in the aquatic ecosystem. In this research, the effect of Cr⁺⁶ in form of K₂Cr₂O₇ was analyzed in ecotoxicity inhibition microbiassays with marine microalgae, *I. galbana* and *C. gracilis* using an estimator of specific population growth to quantify ecotoxicity responses. Bioassays were performed providing results related to the sensibility to K₂Cr₂O₇ analysis, productivity, cost-efficiency and their potential application as tools for routine environmental monitoring. The values of medial Concentration of Inhibition (IC₅₀) from 24 h to 120 h for *I. galbana* were: 11.55 mg L⁻¹ (8.15 – 16.38) (24 h); 14.14 mg L⁻¹ (11.60 – 17.24) (48 h); 4.47 mg L⁻¹ (3.24 – 6.15) (72 h); 11.94 mg L⁻¹ (8.14- 17.49) (96 h) and 19.20 mg L⁻¹ (13.64- 27.26) (120 h). Conversely the values of IC₅₀ from 24 h to 120 h for *C. gracilis* were: 9.21 mg L⁻¹ (7.46 – 11.08) (24 h); 8.13 mg L⁻¹ (2.09 – 15.24) (48 h); 12.51 mg L⁻¹ (6.80 – 20.04) (72 h); 12.17 mg L⁻¹ (2.23- 34.32) (96 h) and 13.34 mg L⁻¹ (1.19- 77.61) (120 h). Temperature and pH values were evaluated in all bioassays. The toxicity of chromium was compared with other aquatic microbiassays. Finally, perspectives of employing these ecotoxicological tools to evaluate environmental risk assessment of chromium in Peru are analyzed.

Key words: bioassays, chromium, ecotoxicology, marine microalgae.

Introducción

Pruebas de ecotoxicidad con microalgas marinas han sido realizadas por numerosos investigadores (Lewis, 1993; Corradi & Gorbi, 1993; Mallick & Mohn, 2003). Para la selección de una microalga marina como herramienta ecotoxicológica deben

conjugarse tanto aspectos biológicos como funcionales de laboratorio (Alayo & Iannacone, 2000). Las ventajas relativas del uso de una microalga en particular dependen del cultivo, crecimiento, manipulación, sensibilidad y abundancia en la naturaleza (Lewis, 1993; Gorbi *et al.*, 2001). Varias

especies de microalgas marinas han sido propuestas como *Thalassiosira* spp. *Dunaliella* spp. e *Isochrysis* sp. (Pawlisz *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2001). No se encuentra, hasta el momento, una especie particular de diatomea marina que haya sido designada como organismo de bioensayo estandarizado (Cifuentes *et al.*, 1998). El Cr^{6+} es un metal pesado capaz de producir una respuesta tóxica en la biota acuática, además es un químico de referencia para la estandarización de nuevos protocolos de bioensayos (APHA, 1995; Villaescusa *et al.*, 1997; Whalley *et al.*, 1999; Cervantes *et al.*, 2001; Gorbi *et al.*, 2002; Blackmore & Wang, 2003; Rocchetta *et al.*, 2003; Kobayashi & Okamura, 2004; Viamajala *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2004). Cifuentes *et al.* (1998), han evaluado microalgas marinas y dulceacuicolas como *Chlamydomonas* sp. Ehrenberg, *Stichococcus bacillaris* Nageli, *Scenedesmus spinosus* Chodat, *Selenastrum capricornutum* (= *Raphidocephis subcapitata*) Printz, *Chlorella* sp. Beijerinck, *Ankistrodesmus* sp. Corda, *Dunaliella lateralis* Pasher y Jahoda, *Isochrysis galbana* Parke y *Dunaliella tertiolecta* Butcher que fueron expuestas al Cr^{6+} bajo la forma de bicromato de potasio.

Las microalgas marinas *Isochrysis galbana* Parke y *Chaetoceros gracilis* Schütt son utilizadas como alimentos de varias especies zoológicas de la cadena trófica marina; a su vez en condiciones de cultivo evita la utilización de la levadura de panificación, disminuyendo la acidificación del medio de cultivo y evitando así perjudicar a la acuicultura marina (Otero *et al.*, 1997; Aranda & Suarez, 1998; Browne *et al.*, 1998; Podemsky *et al.*, 2001; Vera *et al.*, 2001; Gibson, 2003; Mann & Harding, 2003; Yap *et al.*, 2004).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto del Cr^{6+} en la prueba de inhibición de crecimiento de las microalgas marinas *I. galbana* y *C. gracilis*, analizando el efecto del pH, temperatura, tiempo de exposición y punto final del ensayo, usando un estimador de crecimiento poblacional específico para cuantificar la respuesta de toxicidad [Concentración de Inhibición media, CI_{50} en mg L^{-1}] (Blaise *et al.*, 1996). Además se comparó la toxicidad del cromo con otras especies de microalgas.

Materiales y métodos

Diatomeas *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*

Las cepas de *I. galbana* y *C. gracilis* fueron obtenidas del Cepario del Laboratorio de Microalgas del Área de Cultivos Marinos del Instituto del Mar del Perú (IMARPE). Ambas microalgas fueron sembradas inicialmente en Agar-agar en placas Petri y posteriormente transferidas a tubos de ensayo en fase líquida en un medio Guillard "f/2" modificado con agua marina Ultravioleta (UV), filtrada a 0.22μ (Alayo & Iannacone, 2000) con presencia de las sales necesarias, siguiendo la propuesta de la U.S.

Environmental Protection Agency (USEPA, 1978; Vera *et al.*, 2001). Para los cultivos iniciales se utilizaron 8 mL de microalgas mezcladas con agua UV filtrada a 0.45μ bajo las siguientes condiciones: tubos fluorescentes de luz blanca fría colocados a ambos lados de la cámara de cultivo y a la temperatura ambiente de $23^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$. Se realizaron las transferencias al medio fresco cada cuatro días con el fin de mantener un suministro constante de células en fase de crecimiento exponencial.

Bicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) y pruebas de toxicidad

La solución madre a 1000 mg L^{-1} de Cr^{6+} se preparó a partir de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en agua destilada. Las pruebas de ecotoxicidad estáticas, sin aireación se iniciaron cuando el cultivo inicial de *I. galbana* y *C. gracilis* alcanzó una concentración de 30×10^4 células mL^{-1} . Para *I. galbana*, las seis concentraciones de Cr empleadas fueron en orden creciente: 0.65; 1.25; 2.5; 5; 10 y 20 mg L^{-1} . y para *C. gracilis* fueron en orden creciente: 2.5; 6.5; 11.5; 17.5; 24.5 y 32.5 mg L^{-1} . La estimación de la densidad celular se realizó mediante ocho conteos por concentración con la ayuda de un hemocitómetro. Las lecturas se realizaron diariamente entre 24 h y 120 h de exposición (Butterwick *et al.*, 1982). En una de las concentraciones se evaluó exclusivamente el pH y la temperatura, al inicio y cada 24 h de exposición. La salinidad del agua de mar usada en los bioensayos fue de 35 ‰.

Tabla 1. Concentración de Inhibición media (CI_{50}) para *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis* a 24, 48, 72, 96 y 120 h de exposición al Cr^{6+} .

Tiempo de Exposición (h)	CI_{50} (mg l^{-1})			
	<i>Isochrysis galbana</i>	Sig.	<i>Chaetoceros gracilis</i>	Sig.
24	11.55 (8.15 – 16.38)	a	9.21 (7.46 – 11.08)	a
48	14.14 (11.60 – 17.24)	a	8.13 (2.09 – 15.24)	a
72	4.47 (3.24 – 6.15)	b	12.51 (6.80 – 20.04)	a
96	11.94 (8.14 – 17.49)	a	12.17 (2.23 – 34.32)	a
120	19.20 (13.64 – 27.26)	a	13.34 (1.19 – 77.61)	a

Letras minúsculas iguales en una misma columna indica que los promedios son estadísticamente iguales. Valores de Tukey a un nivel de significancia de 0.05. Sig. = Significancia o probabilidad.

Análisis estadístico

Las pruebas de toxicidad se realizaron en tres repeticiones con seis concentraciones nominales más el control, en cada repetición se realizaron cuatro lecturas de densidad microalgal (células mL^{-1}), en un Diseño en Bloques Completamente Aleatorizado (DBCA). La eficacia de los tratamientos se evaluó a través de un ANDEVA.

Tabla 2. Valores comparativos de pH y temperatura del agua de mar entre concentraciones ensayadas para *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*.

<i>Isochrysis galbana</i>					<i>Chaetoceros gracilis</i>				
Concentraciones (mg L ⁻¹)	pH	Sig.	Temperatura	Sig.	Concentraciones (mg L ⁻¹)	pH	Sig.	Temperatura	Sig.
0	8.55± 0,18	a	28.96 ± 0.77	A	0	8.74 ± 0.23	ab	27.69 ± 0.99	a
0.65	8.76 ± 0.22	a	29.10 ± 0.77	A	2.5	8.63 ± 0.17	ab	27.45 ± 1.10	a
1.25	9.06 ± 0.46	a	29.33 ± 0.64	a	6.5	8.81 ± 0.32	ab	28.03 ± 0.85	a
2.5	8.66 ± 0.41	a	29.55 ± 0.70	a	11.5	8.88 ± 0.47	b	28.03 ± 0.76	a
5	8.53 ± 0.18	a	28.83 ± 0.81	a	17.5	8.49 ± 0.21	ab	27.91 ± 0.88	a
10	9.01 ± 0.46	a	28.18 ± 1.33	a	24.5	8.38 ± 0.21	ab	27.91 ± 0.94	a
20	8.75 ± 0.57	a	28.11 ± 0.73	a	32.5	8.32 ± 0.27	a	27.60 ± 0.94	a
F	1.71		2.47		F	3.34		0.35	
Sig.	0.23		0.07		Sig.	0.01**		0.90	

Letras minúsculas iguales en una misma columna indica que los promedios son estadísticamente iguales.

Valores de Tukey a un nivel de significancia de 0.05.

F= Estadístico de Fisher.

Sig. = Significancia o probabilidad.

Tabla 3. Valores comparativos de pH y temperatura del agua de mar entre periodos de exposición para *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*.

<i>Isochrysis galbana</i>					<i>Chaetoceros gracilis</i>				
Periodos de Exposición (h)	pH	Sig.	Temperatura	Sig.	Periodos de Exposición (h)	pH	Sig.	Temperatura	Sig.
0	8.84 ± 0.48	a	28.87 ± 0.83	a	0	8.13 ± 0.20		29.15 ± 0.26	d
24	8.80 ± 0.43	a	28.91 ± 0.95	a	24	8.50 ± 0.11	ab	28.21 ± 0.15	c
48	8.78 ± 0.55	a	29.21 ± 0.55	a	48	8.75 ± 0.26	ab	27.85 ± 0.41	c
72	8.58 ± 0.15	a	28.18 ± 1.48	a	72	8.74 ± 0.24	ab	27.14 ± 0.55	b
96	8.81 ± 0.46	a	28.87 ± 0.78	a	96	8.72 ± 0.22	b	26.55 ± 0.31	a
120	8.76 ± 0.32	a	29.15 ± 0.66	a	120	8.79 ± 0.38	ab	27.91 ± 0.88	c
F	0.34		1.08		F	7,11		47.28	
P	0.88		0.38		P	0.00***		0.00***	

Letras minúsculas iguales en una misma columna indica que los promedios son estadísticamente iguales.

Valores de Tukey a un nivel de significancia de 0.05.

F= Estadístico de Fisher.

Sig. = Significancia o probabilidad.

La Concentración de Inhibición media (CI₅₀) con sus límites de confianza al 95 % se calcularon usando un programa computarizado de la EPA (USEPA, 1993). Se determinó mediante el ANDEVA si existían diferencias entre los valores de pH, temperatura y CI₅₀

entre los cinco periodos de exposición. Además, se usó el ANDEVA para determinar si existían diferencias entre concentraciones ensayadas para cada especie de diatomea. El pH y la temperatura fueron comparados separadamente entre las dos especies de

diatomeas mediante la prueba de t de Student. Para el cálculo de todas las pruebas estadísticas inferenciales se usó el paquete estadístico SPSS versión 9.0.

Resultados

La Tabla 1 muestra los valores de CI_{50} con sus respectivos límites de confianza para los cinco periodos de exposición en *I. galbana* y en *C. gracilis*. Debería esperarse un incremento de la toxicidad del Cr^{6+} al aumentar el tiempo de exposición. Sin embargo, para ambas especies de diatomeas no se encontró este comportamiento (Tabla 1). En *I. galbana* el pH y la temperatura no variaron significativamente entre las concentraciones ensayadas y entre los periodos de exposición del bioensayo (Tabla 2 y 3). En contraste para *C. gracilis*, el pH y la temperatura variaron entre los tiempos de exposición, y solo la temperatura entre las seis concentraciones evaluadas (Tablas 2 y 3). La comparación de los límites de confianza y de los resultados de la prueba de Tukey entre los cinco periodos de exposición de 24 h a 120 h, muestra que no existen diferencias significativas en los valores de CI_{50} para *C. gracilis*; en cambio *I. galbana* mostró diferencias en el valores de CI_{50} entre las 72 h de exposición y los restantes tiempos de exposición. No existieron diferencias significativas entre los valores de pH del agua de mar en ambas especies de diatomeas marinas ($t = 1.75$; $P = 0.08$); en cambio la temperatura de exposición de *I. galbana* fue ligeramente mayor que la de *C. gracilis* ($t = 5.52$; $P = 0.00$). La Tabla 4 nos muestra los valores comparativos de CI_{50} del Cr^{6+} con varias especies de microalgas.

Discusión

Procedimientos de pruebas estándar para conducir pruebas de toxicidad con microalgas marinas han sido publicados por numerosas organizaciones como la Agencia de Protección Ambiental (USEPA, 1978), la Asociación Americana de Salud Pública (APHA, 1995), la Sociedad Americana para la Evaluación de Materiales (ASTM, 1990) y la Organización Internacional para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD, 1984). Con estos métodos estándares, que son muy similares, se determina el efecto tóxico en un crecimiento algal rápido en un medio enriquecido en nutrientes por 3-4 días (Lewis, 1993). La biomasa es medida diariamente o solamente al final de la prueba, el resultado es expresado como una función de la reducción en el crecimiento o biomasa (Janssen, 1998). En nuestro caso se siguió la metodología propuesta por la USEPA (1978), utilizando el método estándar de conteo bajo el microscopio con lecturas diarias y al final de la prueba a 96 h- 120 h de exposición. Sin embargo, a las 120 h de exposición se observa una caída en el crecimiento de la biomasa algal para ambas especies en términos

de CI_{50} (Tabla 1). El control en ambas especies de microalgas mostró una caída en el crecimiento algal a 120 h de exposición. Además, en lugar de usar matraces Erlenmeyer de 125-250 ml de capacidad, se usaron tubos de ensayo de 12.15 ml. No se ha podido determinar si el pequeño volumen de 12.15 ml empleado por tubo influyó en la caída en el crecimiento algal para ambas diatomeas en la microbiopruera. Sin embargo, Alayo & Iannacone (2000) encontraron para *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, una caída en el crecimiento algal a 120 h de exposición y empleando tubo de igual tamaño.

Nylhom & Källqvist (1989) señalan que cualquiera sea el método utilizado para determinar biomasa algal, se tiene que cumplir con la especificidad, facilidad manipulativa, precisión y límite de detección. El conteo bajo el microscopio es el método estándar que permite realizar calibraciones y comparaciones sistemáticas, aunque consume mucho tiempo. Debido a esto, decidimos usar el conteo del número de células mL^{-1} para *C. gracilis* y para *I. galbana*.

Janssen (1998) señala que varios métodos han sido descritos usando como puntos finales de prueba la medición de la fotosíntesis por asimilación de C^{14} , consumo de oxígeno, fluorescencia clorofiliana *in vivo*. Otros métodos, usan como criterio la ingesta de nutrientes o de inhibición enzimática. Las investigaciones tienen el objetivo de incrementar la simplicidad y la eficiencia en el costo de las pruebas algales (Iannacone *et al.*, 1997; Alayo & Iannacone, 2000; Iannacone *et al.*, 2001). Estos procedimientos incluyen la aplicación de la citometría en flujo, técnicas en microplacas e inmovilización algal. Una revisión de las pruebas alternativas a pequeña escala de bioensayos con algas es dada por Blaise *et al.* (1996). Willemsen *et al.* (1995) concluyó al comparar las pruebas microalgales realizadas con las bacterias e invertebrados, que las microalgas son muy sensibles a los metales, pero no muy sensibles a los compuestos orgánicos, como los plaguicidas (Iannacone & Gutierrez, 1999). Lewis (1993, 1995) señala que la CI_{50} obtenida para un mismo tóxico y especie microalgal pueden variar mucho entre diferentes laboratorios, pudiendo esto minimizarse si se realiza bajo condiciones controladas. Así, las condiciones estandarizadas para la realización de los bioensayos con *C. gracilis* y con *I. galbana* se muestran en la Tabla 5.

La capacidad del cromo de inhibir la fotosíntesis ha sido reportada previamente para algunas algas. Los efectos dependen tanto de la naturaleza del organismo (tamaño celular, estructura de la pared celular, reacciones redox causadas por exudados o enzimas) y de la duración de la exposición (Chen *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2003; Zayed & Ferry, 2003).

Tabla 4. Valores comparativos de CI₅₀ con microalgas expuestas al Cr⁶⁺ a diferentes puntos finales de exposición.

Especie	Hábitat	Temperatura (°C)	pH	Efecto	ug L ⁻¹	Referencia bibliográfica
<i>Scenedesmus</i> sp.	D	22	7.4	CI ₅₀ a 96h	100 000	Pawlisz <i>et al.</i> (1997)
<i>Scenedesmus</i> sp.	D	22	ni	CI ₅₀ a 96h	900	Cifuentes <i>et al.</i> , (1998)
<i>Selenastrum capricornutum</i> Printz	D	22	ni	CI ₅₀ a 96h	2 800	Cifuentes <i>et al.</i> (1998)
<i>Skeletonema costatum</i> (Greville) Cleve	M	22	ni	CI ₅₀ a 96h	2 500	Kusk & Nyholm (1992)
<i>Skeletonema costatum</i> (Greville) Cleve	M	15	8.5	CI ₅₀ a 96h	14 700	Cowgill <i>et al.</i> (1989)
<i>Dunaliella bioculata</i> Butcher	M	15	ni	CI ₅₀ a 96h	77 000	Kusk & Nyholm (1992)
<i>Dunaliella lateralis</i> Butcher	M	22	ni	CI ₅₀ a 96h	3 430	Cifuentes <i>et al.</i> (1998)
<i>Chlorella</i> sp.	D	22	ni	CI ₅₀ a 96h	800	Cifuentes <i>et al.</i> (1998)
<i>Isochrysis galbana</i> Parke	M	22	ni	CI ₅₀ a 96h	4 300	Cifuentes <i>et al.</i> (1998)
<i>Chlorella protothecoides</i> Krüg	D	ni	ni	CI ₅₀ a 96h	4 960	Chen <i>et al.</i> (2003)
<i>Synechococcus</i> sp.	D	ni	ni	CI ₅₀ a 96h	6 500	Chen <i>et al.</i> (2003)
<i>Spirulina maxina</i> Setch & Garner	D	ni	ni	CI ₅₀ a 96h	11 160	Chen <i>et al.</i> (2003)
<i>Spirulina platensis</i> (Norst.) Geitler	D	ni	ni	CI ₅₀ a 96h	11 740	Chen <i>et al.</i> (2003)
<i>Selenastrum capricornutum</i> Printz	D	ni	ni	CI ₅₀ a 96h	12 430	Chen <i>et al.</i> (2003)
<i>Scenedesmus quadricauda</i> (Turp.) Bréb.	D	ni	ni	CI ₅₀ a 96h	20 890	Chen <i>et al.</i> (2003)
<i>Skeletonema costatum</i> (Greville) Cleve	M	27	8.4	CI ₅₀ a 96h	122-273	Alayo & Iannacone (2000)
<i>Chaetoceros gracilis</i> Schütt	M	27.9	8.7	CI ₅₀ a 120h	13 340	Original
<i>Chaetoceros gracilis</i> Schütt	M	26.5	8.7	CI ₅₀ a 96h	12 170	Original
<i>Chaetoceros gracilis</i> Schütt	M	27.1	8.7	CI ₅₀ a 72h	12 510	Original
<i>Chaetoceros gracilis</i> Schütt	M	27.8	8.7	CI ₅₀ a 48h	8 130	Original
<i>Chaetoceros gracilis</i> Schütt	M	28.2	8.5	CI ₅₀ a 24h	9 210	Original
<i>Isochrysis galbana</i> Parke	M	29.1	8.7	CI ₅₀ a 120h	19 200	Original
<i>Isochrysis galbana</i> Parke	M	28.8	8.8	CI ₅₀ a 96h	11 940	Original
<i>Isochrysis galbana</i> Parke	M	28.1	8.5	CI ₅₀ a 72h	4 470	Original
<i>Isochrysis galbana</i> Parke	M	29.2	8.7	CI ₅₀ a 48h	14 140	Original
<i>Isochrysis galbana</i> Parke	M	28.9	8.8	CI ₅₀ a 24h	11 550	Original

D = Dulceacuícola; M = Marino; ni = no indicado.

Las microalgas como *Isochrysis* sp., *Thalassiosira mariae-leburiae* Cleve, *Pavlova lutheri* (Droop) Green y *I. galbana* presentan CI_{50s} al Cr⁶⁺ de 1 300 µg L⁻¹, 900 µg L⁻¹, 1 700 µg L⁻¹ y 4 300 µg L⁻¹ respectivamente, y muestran valores más bajos que los encontrados en nuestro trabajo (Tablas 1 y 4). La microalga *Euglena gracilis* Klebs es considerada como un modelo intermedio entre los sistemas bacteriales y los modelos animales; se ha observado que el cromo no produce un efecto mutagénico, pero provoca efectos adversos en la curva de crecimiento

microalgal (Gajdosova & Reichrtova, 1996). Wong & Chang (1991) indican que el Cr provoca efectos en el crecimiento, la fotosíntesis y en la síntesis de clorofila A del alga *Chlorella protothecoides* Krüg (*C. pyrenoidosa*), y que actúa sinérgicamente con el Cu y el Pb.

El ensayo con estas microalgas son fácilmente reproducibles y de bajo costo, pudiéndose llevar a cabo en un laboratorio de escasos recursos económicos. Este bioensayo puede usarse como una

herramienta alternativa para el monitoreo ambiental de rutina (Lewis, 1993).

Tabla 5. Condiciones y criterios de aceptabilidad de la prueba de toxicidad con *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*.

Tipo de bioensayo	: Estático.
Tiempo de exposición	: 24, 48, 72, 96 y 120 h.
Temperatura	: 26°C a 29°C.
Calidad de luz	: Iluminación con fluorescente de luz blanca.
Fotoperiodo	: 24 h luz.
Tamaño de envase	: 12.5 ml.
Volumen de solución	: 8 ml.
Edad de organismos	: células en fase exponencial < 72 h.
N° réplicas por concentración	: 2.
N° de concentraciones más control	: 7.
Aireación	: Ausente.
Tiempo de observación en la placa de conteo	: conteo en hemocitómetro para el cálculo de N° de células ml ⁻¹ .
Respuesta Subletal	: disminución de la biomasa microalgal.
Criterio de aceptabilidad	: ajustabilidad de la curva de inhibición.

Conclusiones

Ambas especies de microalgas marinas *I. galbana* y *C. gracilis* presentan similar sensibilidad al Cr, y por ende son adecuadas como microbiopruebas de ecotoxicidad. Sin embargo, la menor variabilidad en *I. galbana* del pH y la temperatura entre las concentraciones ensayadas y entre los periodos de exposición, proporcionan ventajas comparativas y recomiendan a esta especie para su empleo en bioensayos a 24 h de exposición (fase de crecimiento exponencial) y con un valor de CI₅₀ como punto final.

Literatura citada

Alayo M. & Iannacone J. 2000. La microalga marina *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, como bioensayo alternativo para la evaluación del cromo. *Wiñay Yachay*. 4(2): 69-75.

APHA. (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WPCF (Water Pollution Control Federation). 1995. Standard methods for examination of water and wastewater. 19th. Ed. American Health Association. Washington, D.C.

Aranda A.D. & Suarez P. 1998. Overview of diets used in larviculture of three caribbean conchs: Queen conch *Strombus gigas*, Milk conch *Strombus costatus* and Fighting conch *Strombus pugilis*. *Aquaculture*. 167: 163-178.

ASTM (American Society for Testing and Materials). 1990. Standard guide for conducting static 96h toxicity tests with microalgae, E1218-90. ASTM, Philadelphia.

Blackmore G. & Wang W.X. 2003. Inter-population differences in Cd, Cr, Se, and Zn accumulation by the green mussel *Perna viridis* acclimated at

different salinities. *Aquatic Toxicology*. 62: 205-218.

Blaise C., Féraud J.F. & Vasseur P. 1996. Microplate toxicity tests with microalgae: a review. En: *Microscale toxicology, advances, techniques and practice*, Wells, P.G., Lee K., Blaise, C. (Eds.), CRC Publishers.

Browme K.A., Tamburri M.N. & Zimmer-Faust R.K. 1998. Modelling quantitative structure-activity relationships between animal behavior and environmental signal molecule. *The Journal of Experimental Biology*. 201: 245-258.

Butterwick C., Heaney S.I. & Talling J.F. 1982. A comparison of eight methods for estimating the biomass and growth of planktonic algae. *British Phycology Journal*. 17: 69-79.

Cervantes C., Campos-García J., Devars S., Gutierrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzman J.C. & Moreno-Sanchez R. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Review*. 25: 335-347.

Chen H., Pan G., Yan H. & Qin Y. 2003. Toxic effects of hexavalent chromium on the growth of the blue-green microalgae [Artículo en Chino]. *Huan Jing Ke Xue*. 24: 13-18.

Cifuentes A.S., Silva J., Bay-Schmith E. & Larrain A. 1998. Selección de cepas de microalgas para ser utilizadas en bioensayos de toxicidad. *Rev. Gayana Oceanol.* 6: 1-9.

Corradi M.G. & Gorbi G. 1993. Chromium toxicity on two linked trophic levels. II. Morphophysiological effects on *Scenedesmus acutus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 25: 72-78.

Cowgill U., Milazzo D. & Landenber B. 1989. Toxicity of nine benchmark chemicals to *Skeletonema costatum*, a marine diatom. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 8: 451-455.

Gajdosova J. & Reichrtova E. 1996. Different growth response of *Euglena gracilis* to Hg, Cd, Cr and Ni compounds. *Analysis and Bioanalysis Chemistry*. 354: 641-642.

Gorbi G., Corradi M.G., Invidia M. & Bassi M. 2001. Light intensity influences chromium bioaccumulation and toxicity in *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 48: 36-42.

Gorbi G., Corradi M.G., Invidia M., Rivara L. & Bassi M. 2002. Is Cr(VI) toxicity to *Daphnia magna* modified by food availability or algal exudates? The hypothesis of a specific chromium/algae/exudates interaction. *Water Research*. 36: 1917-1926.

Gibson G.D. 2003. Larval development and metamorphosis in *Pleurobranchaea maculate*, with a review of development in the Notaspidea (Opisthobranchia). *Biological Bulletin*. 205: 121-132.

- Iannacone J. & Gutierrez A. 1999. Ecotoxicidad de los agroquímicos lindano y clorpirifos sobre el nematodo *Panagrellus*, la microalga *Chlorella* y el ensayo con *Allium*. Agricultura técnica (Chile). 59: 85-95.
- Iannacone J., Gutierrez A.I. & Vargas R.N. 1997. Ecotoxicidad de la cuenca alta del río Rimac (Tamboraque y Perubar) utilizando al nematodo *Panagrellus redivivus* y a la microalga *Chlorella vulgaris*. Hipótesis (Perú). 5: 38-45.
- Iannacone J., Alvaríño L. & Arrascue A. 2001. Inhibición por metales pesados en el ensayo ecotoxicológico con la microalga *Chlorella vulgaris*. Biota. 100: 138-144.
- Janssen C. 1998. Alternative assay for routine toxicity assessments: a review. En: Ecotoxicology. G. Schüürmann & B. Markert (Eds.). John Wiley & Sons. Chapter. 26: 813-839.
- Kobayashi N. & Okamura H. 2004. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. 1. Tracing the cause by the effects. Chemosphere. 55: 1403-1412.
- Kusk K. & Nyholm N. 1992. Toxic effects of chlorinated compounds and potassium dichromate on growth rate and photosynthesis of marine phytoplankton. Chemosphere. 25: 875-886.
- Lewis M.A. 1993. Freshwater primary producers. En: Handbook of Ecotoxicology. Calow, P. (ed.). Blackwell Scientific Publ. U.K. : 28-51.
- Lewis M.A. 1995. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. Environmental Pollution. 87: 319-336.
- Mallick N. & Mohn F.H. 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 55: 64-69.
- Mann R. & Harding J.M. 2003. Salinity tolerance of larval *Rapana venosa*: implications for dispersal and establishment of an invading predatory gastropod on the North American Atlantic Coast. Biological Bulletin. 204: 96-103.
- Nyholm N. & Källqvist T. 1989. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. Environmental Toxicology and Chemistry. 8: 689-703.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 1984. Algal growth inhibition test. OECD Guideline for testing Chemicals, No. 201, OECD, Geneva.
- Otero A., García D., Morales E.D., Arán J. & Fábregas J. 1997. Manipulation of the biochemical composition of the eicosapentaenoic acid-rich microalga *Isochrysis galbana* in semicontinuous cultures. Biotechnology and Applied Biochemical. 26: 171-177.
- Pawlisz A.V., Kent R.A., Schneider U.A. & Jefferson C. 1997. Canadian Water quality Guidelines for chromium. Environmental Toxicology and Water Quality. 12: 185-193.
- Pinto E., Sigaud-Kutner T.C.S., Leitao M.A.S., Okamoto O.K., Morse D. & Colepiloco P. 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. Journal of Phycology. 39: 1008-1018.
- Podemski C.L. & Culp J.M. 2001. Toxicant interaction with food algae: A missing link between laboratory and field effects? Environmental Toxicology. 16: 31-42.
- Rocchetta I., Ruiz L.B., Magaz G. & Conforti V.T. 2003. Effects of hexavalent chromium in two strains of *Euglena gracilis*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 70: 1045-1051.
- Silva J., Iannacone J., Cifuentes L., Troncoso L., Bay-Schmith E. & Larrain A. 2001. Assessment of sensitivity to Pentachlorophenol (PCP) in 18 aquatic species, using acute and chronic ecotoxicity bioassays. Ecotoxicology and Environmental Restoration. 4: 10-17.
- Stauber J.L. & Florence T.M. 1990. Mechanism of toxicity of zinc to the marine diatom *Nitzschia closterium*. Marine Biology. 105: 519-524.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1978. *Selenastrum capricornutum* Printz algal assay: Bottle test. EPA-600/9-78-018, Corvallis, OR.
- Vera G., Tam J., Pinto E. & Angulo J. 2001. Efecto del cadmio sobre el crecimiento poblacional de la diatomea marina *Chaetoceros gracilis* Schütt. Revista peruana de Biología. 8: 23-29.
- Viamajala S., Peyton B.M., Sani R.K., Apel W.A. & Petersen J.N. 2004. Toxic effects of chromium (VI) on anaerobic and aerobic growth of *Shewanella oneidensis* MR-1. Biotechnology Progress. 20: 87-95.
- Walsh G.E., Yoder M.J., Mclaughlin L.L. & Lores E.M. 1987. Response of marine unicellular algae to brominated organic compounds in six growth media. Ecotoxicology and Environmental Safety. 14: 215-222.
- Whalley C., Hursthouse A., Rowlett S., Iqbal-Zahid P., Vaughan H., Durant R.D. 1999. Chromium speciation in natural draining contaminated land, Glasgow, UK. Water, Air and Soil Pollution. 112: 389-405.
- Willemsen A., Vaal M.A. & de Zwart D. 1995. Microbiotests as tools for environmental monitoring. National Institute of Public Health and Environmental Planning (RIVM). The Netherlands, report No 9, 607042005.
- Wong P.K. & Chang L. 1991. Effects of copper, chromium and nickel on the growth, photosynthesis and chlorophyll synthesis of *Chlorella pyrenoides*. Environmental Pollution. 72: 127-139.

- Villaescusa I., Martí S., Matas C., Martínez M. & Ribo J.M. 1997. Chromium (VI) toxicity to luminescent bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16: 871-874.
- Yap C.K., Ismail A., Omar H. & Tan S.G. 2004. Toxicities and tolerances of Cd, Cu, Pb and Zn in as primary producer (*Isochrysis galbana*) and in a primary consumer (*Perna viridis*). *Environmental International*. 29: 1097-1104.
- Zayed A.M. & Terry M. 2003. Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant and Soil*. 249: 139-156.
- Zhu Y., Wang J., Bai Y. & Zhang R. 2004. Cadmium, chromium, and copper induce polychromatocyte micronuclei in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*. 72: 78-86.

¹ Laboratorio de Ecofisiología Animal. Facultad de Ciencias Naturales y matemáticas. Universidad Nacional Federico Villarreal. Calle San Marcos 383, Lima – Perú. Correo electrónico: missalayo@hotmail.com

² Laboratorio de Ecofisiología Animal. Facultad de Ciencias Naturales y matemáticas. Universidad Nacional Federico Villarreal. Calle San Marcos 383, Lima – Perú. Correo electrónico: joseiannacone@hotmail.com

³ Laboratorio de Ecofisiología Animal. Facultad de Ciencias Naturales y matemáticas. Universidad Nacional Federico Villarreal. Calle San Marcos 383, Lima – Perú.