

RESPUESTA DE LAS CIANOBACTERIAS TROPICALES *SYNECHOCYSTIS MINUSCULA* Y *LIMNOTHRIX* SP. A DERIVADOS DEL PETRÓLEO

RESPONSES FROM TROPICAL CYANOBACTERIAE *SYNECHOCYSTIS MINUSCULA* AND *LIMNOTHRIX* SP. TO PETROLEUM DERIVATIVES

Beltrán Briceño, Lorena Jonte, José Ortega, Néstor Rosales y Ever Morales.

Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. Dirección de Correspondencia: Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, División de Estudios para Graduados. Av. Universidad Edificio Grano de Oro 2^{do} Piso. Apartado Postal 526. E-mail: everm@iamnet.com.

RESUMEN

Los hidrocarburos son altamente tóxicos para el fitoplancton, pero para evaluar este impacto es conveniente realizar bioensayos en condiciones controladas de laboratorio. En este trabajo se analizó el efecto de diferentes concentraciones de Fracción Soluble de Petróleo (FSP) (10, 50 y 100%) y Queroseno (1, 3 y 6%) sobre el crecimiento y el contenido de pigmentos de las cianobacterias *Synechocystis minuscula* y *Limnothrix* sp. aisladas de una laguna de aguas residuales y de un pozo de agua salino, respectivamente. Los cultivos se realizaron por triplicado, con medio de cultivo ALGAL 8mM NaNO₃ suplementado con las diferentes concentraciones de los hidrocarburos y a un volumen de 80 ml en frascos con una capacidad de 125 ml. Todos los tratamientos fueron mantenidos en agitación a 150 rpm, irradiancia de 156 $\mu\text{mol q m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo 12:12 h y a 28 \pm 2° C durante 28 días. El crecimiento fue seguido mediante recuento celular, densidad óptica, peso de la materia seca y clorofila. La FSP no ejerció efecto sobre el crecimiento y el contenido celular de pigmentos fue similar al control. En cambio, el queroseno ejerció efecto inhibitorio. En *Synechocystis minuscula* se obtuvo una disminución significativa ($p < 0.05$) del crecimiento con porcentajes menores al 38% en los cultivos expuestos a 3 % de queroseno con porcentajes menores al 38%. La influencia del queroseno se observó también en el contenido celular de pigmentos: la Clorofila *a* en *Synechocystis minuscula* y *Limnothrix* sp. disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en función de la concentración de queroseno; se obtuvo resultados similares con el contenido de carotenoides y ficocianina. Los resultados obtenidos con las cianobacterias *Synechocystis minuscula* y *Limnothrix* sp. sugieren que hay tolerancia a la FSP y sensibilidad al queroseno.

ABSTRACT

Hydrocarbons are highly toxic to phytoplankton. However, to evaluate this impact it is convenient to carry out bioassays in controlled laboratory conditions. This research analyzed the effect of different concentrations of water soluble fraction (WSF) of petroleum (10, 50 and 100%) and kerosene (1, 3 and 6%) on the growth and pigment content of cyanobacteria *Synechocystis minuscula* and *Limnothrix* sp. isolated in a pond of water and a brackish water well, respectively. Cultures were made in triplicate using ALGAL medium NaNO₃ 8mM supplemented with the different hydrocarbon concentrations at a volume of 80 ml in 125-ml bottles. All samples were kept under constant shaking at 150 rpm, irradiance of 156 $\mu\text{mol q m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, photoperiod 12:12 H and at 28 \pm 2 °C during 28 days. Algal growth was studied via cellular count, optical density, dry weight and chlorophyll. WSF had no effect on growth, and cellular content of pigments was similar to the control. On the other hand, kerosene showed an inhibitory effect. In *Synechocystis minuscula*, a significant reduction was obtained ($p < 0.05$) from cultures exposed at 3% kerosene. The influence of kerosene was also observed in the contents of pigments. Chlorophyll *a* in *Synechocystis minuscula* and *Limnothrix* sp. decreased significantly ($p < 0.05$) relative to the kerosene concentration; similar results were obtained for carotenoid and phycocyanin. Results with *Synechocystis minuscula* and *Limnothrix* sp. cyanobacteria suggest tolerance to WSF but sensitivity to kerosene.

Palabras clave: cianobacterias, petróleo, toxicidad, crecimiento, clorofila, carotenoides.

Keywords: cyanobacteria, petroleum, toxicity, growth, chlorophyll, carotene.

INTRODUCCIÓN.

La contaminación con crudo en los ecosistemas acuáticos se debe en la mayoría de los casos a la actividad antropogénica a través de derrames durante la explotación, transporte y refinación del petróleo, rupturas de oleoductos, condensación de los escapes de motores diesel y de gasolina, agua de desagües industriales y domésticos, entre otros (Leahy y Colwell, 1990).

En la cuenca del Lago de Maracaibo, en Venezuela, los derrames han deteriorado las playas y destruido parte de su flora y fauna. Este problema no es nuevo ya que hace 30 años se realizó un estudio del efecto de los derrames sobre la biota del lago y los resultados revelaron que la contaminación del Lago de Maracaibo por petróleo era alarmante y que ninguna solución completa era previsible para los próximos años, ya que la solución ideal estaría vinculada a la detención total del vertido de petróleo en el lago, lo que implicaría un cese de las actividades petroleras en la región (Creole Petroleum Corporation, 1974).

Los hidrocarburos son altamente tóxicos para las especies planctónicas y promueven la aparición de alteraciones en los mecanismos de multiplicación a concentraciones del orden de 0.001 ppm (O'Sullivan y Jacques, 2001). Los estudios realizados para evaluar los efectos de la contaminación petrolera sobre el fitoplancton marino y de agua dulce han demostrado que el crudo es tóxico para el crecimiento y la fotosíntesis de la mayoría de microalgas y cianobacterias (Vandermeulen y Ahern, 1976; Ignatiades y Minicos, 1977; Tukaj y Bohdanowicz, 1995). A causa de la complejidad del ambiente marino es difícil establecer el grado de deterioro de las especies o comunidades por influencia del crudo. Por esta razón conviene realizar bioensayos *in vitro* utilizando organismos vivos en condiciones controladas de laboratorio sin olvidar que el objetivo primordial de un bioensayo es reflejar la realidad de cómo afectaría a los organismos vivos en su medio natural. Para ello, es necesario investigar continuamente y en paralelo las comunidades marinas en su propio hábitat (Villamar, 1996).

Vandermeulen y Ahern (1976), publicaron una revisión de los estudios más resaltantes desde 1935

hasta 1975 y señalan que los efectos más comunes fueron disminución o inhibición del crecimiento y fijación de Carbono, disminución o aumento del tamaño celular, modificación de la polimerización de ADN e inhibición de biosíntesis de ADN y ARN. Estudios posteriores han ayudado a reforzar y profundizar estos hallazgos (Karydis, 1982; Morales-Loo y Goutx, 1990; Liebe y Fock, 1992; Megharaj y col., 2000) y muestran que la toxicidad de los hidrocarburos *in vitro* varía dependiendo de los diferentes tipos de crudos, fracciones y derivados. La sensibilidad de las especies planctónicas también varía con la posición filogenética, los clones dentro de las especies, las condiciones de cultivo y la concentración de los agentes evaluados.

O'Brien y Dixon (1976), señalaron que los efectos de los hidrocarburos sobre los microorganismos fotosintéticos pueden ser estudiados a nivel: (a) celular, mediante los diferentes cambios fisiológicos y morfológicos; (b) de cultivos, con especies seleccionadas a diferentes concentraciones; (c) de poblaciones del fitoplancton *in situ* (distribución y abundancia), a fin de evaluar los efectos diferenciales sobre varias especies sensibles y/o resistentes dentro de la comunidad.

En Venezuela los trabajos de toxicidad de los hidrocarburos sobre microorganismos fotosintéticos son escasos (Díaz, 1983; Silva, 1989) y se tiene poco conocimiento del papel que puedan desempeñar cianobacterias autóctonas en estos procesos. El objetivo primordial de este trabajo consistió en evaluar el crecimiento y producción de pigmentos de cultivos de las cianobacterias autóctonas *Synechocystis minuscula* y *Limnothrix* sp. expuestas a diferentes concentraciones de Queroseno y Fracción Soluble de Crudo Liviano.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Cianobacterias.

Se utilizaron cultivos no axénicos de *Synechocystis minuscula*, aislada de una Laguna de aguas residuales urbanas de la ciudad de Maracaibo, y de *Limnothrix* sp. aislada del pozo de aguas de Salina Rica, ubicada en la zona Noreste de Maracaibo.

Medios de Cultivo.

Medio Inorgánico: para la preparación del medio de cultivo de *Synechocystis minuscula* se utilizó agua potable y para *Limnothrix* sp. agua de mar a 35%, ambas filtradas y esterilizadas en autoclave (Jonte, 2003; Clemente, 2000). Tanto el agua potable como el agua de mar fueron enriquecidas con Medio ALGAL (Bionova, España) hasta obtener una concentración equivalente a 8 mM de NO_3^- (Fábregas y col., 1984).

Medios Orgánicos: la Fracción Soluble de Petróleo (FSP) se obtuvo mediante el procedimiento descrito por Tukaj (1987) y se utilizó crudo liviano Chevron LL-92 extraído en el Municipio Lagunillas, Costa Oriental del Lago de Maracaibo (Tabla 1). La FSP al 100% fue suplementada con Medio ALGAL (8 mM de NO_3^-) y para las concentraciones de 10 y 50% se mezcló con agua potable para los cultivos de *Synechocystis minuscula* o agua de mar a 35 % para los cultivos de *Limnothrix* sp., manteniendo la concentración de nitrato. Se utilizó queroseno comercial empleado generalmente para limpieza, iluminación y como combustible para máquinas de combustión interna. El queroseno fue previamente esterilizado por filtración utilizando membranas de borosilicato de 47 mm de diámetro y 0.45 μm de poro (MFS, Pleasanton, USA). Al medio inorgánico (8 mM NO_3^-) se le agregó queroseno estéril para obtener concentraciones de 1, 3 y 6% (v/v).

Tabla 1. Características físico-químicas del crudo liviano Chevron LL-92.

Contenido de Agua (% v/v)	0.30
Gravedad API (60 °F)	38.1
Densidad (60 °F)	0.8343
Emulsión (% v/v)	0.10
Asfaltenos (% p/p)	0.87
Parafinas (% p/p)	7.81
Viscosidad Cinemática (70 °F)	4.36

Sistema de Cultivo.

Se realizaron cultivos discontinuos en envases de vidrio de 225 ml de capacidad con 80 ml de medio

de cultivo, con tres réplicas por tratamiento. Los frascos se agitaron constantemente a 150 rpm en un equipo para agitación Lab Line Modelo 3520. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 25 ± 2 °C durante 28 días con un ciclo de luz:oscuridad 12:12 h mediante un temporizador Paragon Electric modelo 4001-00 y se iluminaron con lámparas fluorescentes Philips Daylight de cuatro tubos de 40 W, a una intensidad luminosa de $156 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, medida con un fotómetro Lutron Lx-101.

Bioensayos.

Se evaluó el efecto de la FSP a 10, 50 y 100% (v/v) y del queroseno a 1, 3 y 6% (v/v) sobre ambas cianobacterias, con un volumen de cultivo de 80 ml. Para *Synechocystis minuscula* se utilizó un inóculo de 0.08 de absorbancia ($\text{DO}_{750\text{nm}}$), propuesto por Jonte (2003) y que correspondió a 20×10^6 cel ml^{-1} y para *Limnothrix* sp. 3.5 mg ml^{-1} de materia seca y/o 2.10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de Clorofila. Como control se utilizó cultivos que no presentaban FSP ni queroseno y que sólo contenían medio inorgánico a 8mM de NO_3^- (Fábregas y col., 1984).

Análisis.

El crecimiento celular y el contenido de pigmentos por espectrofotometría se evaluaron cada cuatro días. El crecimiento se determinó mediante densidad celular (Arredondo y col., 1997) solo con *Synechocystis minuscula*. En *Limnothrix* sp. no se evaluó este parámetro debido a su naturaleza filamentosa, por lo cual el crecimiento se determinó midiendo la densidad óptica a 750 nm en los cultivos expuestos a FSP. El contenido de pigmentos liposolubles clorofila *a* y carotenoides fue analizado a partir de cultivos frescos de los diferentes tratamientos. La extracción se realizó con metanol 99% grado reactivo (GR) y los extractos se midieron a longitudes de onda de 480 y 665 nm en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 21D contra un blanco de metanol 99% GR. La concentración de clorofila *a* ($\mu\text{g ml}^{-1}$) se calculó a partir de la ecuación propuesta por Marker y col., (1980). Para la determinación del contenido celular de carotenoides totales ($\mu\text{g ml}^{-1}$) se utilizó la ecuación propuesta por Strickland y Parsons (1972). Los pigmentos hidrosolubles ficocianinas y aloficocianinas se extrajeron sólo en *Limnothrix* sp. ya que

la concentración de estos pigmentos en *Synechocystis minuscula* es muy baja y con la técnica utilizada no se puede detectar (Jonte, 2003). El contenido de ficocianina y aloficocianina ($\mu\text{g ml}^{-1}$) se midió a longitudes de onda de 652 y 615 nm respectivamente y la concentración se calculó de acuerdo a la fórmula de Bennet y Bogorad (1973). En ambas cianobacterias también se realizaron estimaciones de peso de materia seca mediante la ecuación propuesta por Utting (1985).

Los datos obtenidos en fase estacionaria de cada grupo de cianobacterias se compararon mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía para la determinación de grupos significativamente diferentes. En todos los casos donde la prueba F resultó significativa, se empleó la prueba de rangos múltiples de Scheffé a un nivel de significancia $p=0.05$ mediante el programa estadístico SPSS para Windows versión 10.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Efecto del queroseno sobre cultivos discontinuos de *Synechocystis minuscula* y *Limnothrix* sp.

La exposición de los cultivos de *Synechocystis minuscula* y *Limnothrix* sp. a 1, 3 y 6% (v/v) de queroseno se analizó con la finalidad de determinar los efectos del hidrocarburo sobre el crecimiento y producción de pigmentos de esas cianobacterias.

Se observó que el crecimiento de *Synechocystis minuscula* se inhibió a partir de 3%, detectándose en la curva de crecimiento dos tendencias (Fig. 1a): la primera representada por el control y el cultivo con 1% de queroseno, y la segunda integrada por los cultivos expuestos a 3% y 6% de queroseno. En fase estacionaria se observó que en el cultivo con 1% de queroseno se presentó una disminución significativa en la densidad de células ($p < 0.05$) de 7.26% ($224.82 \pm 18.58 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$) con respecto al control ($242.66 \pm 4.86 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$), mientras que los cultivos expuestos con 3% ($92.72 \pm 8.82 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$) y 6% ($68.8 \pm 10.17 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$) de queroseno presentaron una disminución significativa ($p < 0.05$) del 61.75 y 71.62% (Fig. 2).

El crecimiento de *Limnothrix* sp. se evaluó con relación al contenido de clorofila *a* debido a que la

naturaleza filamentosa de esta cianobacteria no permite el conteo del número real de células (Perona 1995, Clemente 2000) y a que la interferencia de la fase orgánica inmiscible del queroseno en el medio de cultivo impide una homogenización del cultivo, por lo cual no se puede analizar mediante turbidez. Los cambios en el contenido de clorofila *a* obtenidos en el experimento indican que la biomasa de esa cianobacteria varía describiendo una curva típica de crecimiento de un microorganismo en cultivo discontinuo (Fig. 1b).

Se ha demostrado ampliamente la inhibición del crecimiento microalgal por hidrocarburos del petróleo (Vandermeulen y Ahern, 1976; Vestal y col., 1984). El queroseno, el diesel y los combustibles para aviones constituyen derivados hidrocarbonados de la destilación media del petróleo que contienen mezclas de parafinas, naftenos e hidrocarburos aromáticos, los cuales son tóxicos para las microalgas (Soto y col., 1975; Fábregas y col., 1984; Villamar 1996).

El efecto del queroseno sobre los microorganismos fotosintéticos depende de la concentración, la especie y el tiempo de exposición (Mironov, 1968). Por otra parte, se ha encontrado que la tasa de crecimiento de *Anacystis nidulans*, *Selenastrum capricornutum*, *Chlorella vulgaris* y *Oocystis* sp. disminuyó en cultivos con aceite de ignición (Gaur y Kumar, 1981). Así mismo, se ha reportado inhibición en el crecimiento de *Chlamydomonas reinherdtii* bajo una exposición de iso-octanos al 0.12% (v/v) extraídos previamente de diesel (Liebe y Fock, 1992).

La influencia del queroseno se observó también en el contenido celular de pigmentos. El contenido celular de Clorofila *a* en *Synechocystis minuscula* y *Limnothrix* sp. disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en función de la concentración de queroseno (Figs. 2 y 3). En el caso de *Synechocystis minuscula*, las menores concentraciones de clorofila *a* en fase estacionaria se obtuvieron en los cultivos de 6% ($31.92 \pm 9.88 \text{ fg cel}^{-1}$) y 3% ($35.29 \pm 6.21 \times 10^6 \text{ fg cel}^{-1}$) de queroseno, observándose una reducción significativa ($p < 0.05$) de 38.08% y 31.54%, respectivamente. En los cultivos expuestos a 1% de queroseno se observó una reducción significativa ($p < 0.05$) de Clorofila *a* de 8.75% con $47.04 \pm 2.90 \times 10^6 \text{ fg cel}^{-1}$.

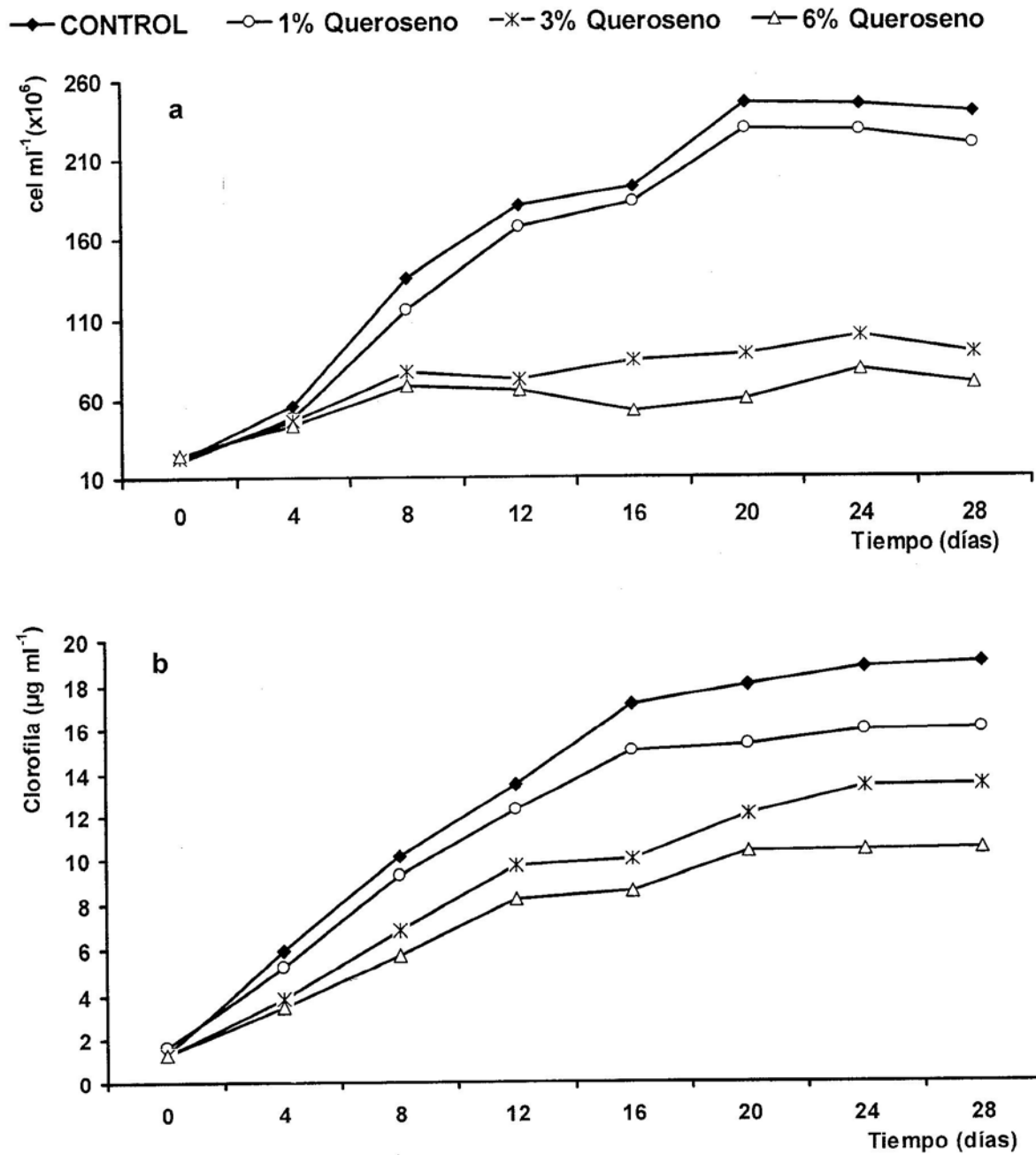


Figura 1. (a) Influencia del queroseno sobre el crecimiento ($\times 10^6$ cel ml⁻¹) de *Synechocystis minuscula* en cultivo discontinuo. (b) Influencia del queroseno sobre el contenido de clorofila *a* de *Limnothrix* sp. en cultivo discontinuo.

Los cultivos de *Limnothrix* sp. en fase estacionaria exhibieron el mismo comportamiento que *Synechocystis minuscula* y se observó una reducción significativa ($p < 0.05$) de Clorofila *a* con respecto al control. En los cultivos expuestos al 1% de queroseno se observó una reducción de Clorofila *a* de 14% ($15.42 \pm 0.95 \mu\text{g ml}^{-1}$), con 3% hubo una reducción del 33.96% ($11.84 \pm 1.53 \mu\text{g ml}^{-1}$) y con 6% de queroseno se observó la menor concentración con $9.78 \pm 1.16 \mu\text{g ml}^{-1}$ y una reducción de 45.45% (Fig. 3).

El contenido celular de carotenoides en cultivos de *Synechocystis minuscula* expuestos a 1% de queroseno no fue afectado. Sin embargo, a 3 y 6% se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) con concentraciones de 8.33 ± 1.27 y $8.48 \pm 2.84 \text{ fg cel}^{-1}$ respectivamente, que corresponden respectivamente a 39, 40 y 40.41% de reducción con respecto al control. En *Limnothrix* sp. el contenido de carotenoides y ficocianina disminuyó significativamente ($p < 0.05$) con la concentración de queroseno. En los cultivos con 1, 3 y 6% de queroseno, el contenido de carotenoides con respecto al control disminuyó en un 11.11; 22.25 y 30.93%, respectivamente. El mínimo contenido de ficocianina ($49.17 \pm 10.21 \mu\text{g ml}^{-1}$) se observó en el ensayo con 6% de queroseno y se obtuvo una reducción del 55.98% (Fig. 3).

Corner (1978) demostró que diversos crudos tienen un efecto directo sobre los niveles de Clorofila *a*. Algunos autores señalan que la toxicidad del crudo y de los refinados se debe más a una interferencia con la cadena transportadora de electrones que a algún efecto directo sobre la molécula de clorofila. Algunos componentes del petróleo y sus derivados inhiben el incremento del pH del medio extracelular inducido por la luz, por lo que se presume que esta inhibición pueda estar ligada a la captura del protón por parte de las microalgas (Armstrong y Calder, 1978). Morales-Loo y Goutx (1990), encontraron que la disminución del contenido de clorofila *a* y del máximo de pigmentos asociados a glucolípidos y monoglicéridos en *Asterionella glacialis*, *Rhodomonas lens* y *Dunaliella tertiolecta* puede estar relacionada con el daño de la estructura de los cloroplastos y la inhibición de la biosíntesis de clorofila.

Los valores de materia seca disminuyeron en función de la concentración de queroseno. En

Synechocystis minuscula el tratamiento con 1% no mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control, pero en los tratamientos de 3 y 6% se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) de esta variable. El menor valor de materia seca ($0.87 \pm 0.04 \text{ mg ml}^{-1}$) se registró en el cultivo con 6% de queroseno y se encontró una reducción de 73.23%. En *Limnothrix* sp. se observó una menor reducción en los valores de materia seca. En los cultivos con 1% de queroseno se observó una disminución de 10.32% y en aquellos con 3 y 6%, la disminución fue de 21.93 y 26.45%, respectivamente. Estos resultados coinciden con la valoración del crecimiento seguido mediante cuantificación de la Clorofila *a*, en la cual se detectó el mayor valor de materia seca en el control y una disminución con respecto a las diferentes concentraciones de queroseno utilizadas (Fig. 1b). La reducción del valor de materia seca con el queroseno puede deberse a la fuerte reducción de la población de estas cianobacterias, lo cual puede considerarse como un efecto indirecto del hidrocarburo (Fábregas y col. 1984, Tukaj 1987).

Efecto de las Fracciones Solubles de Petróleo sobre cultivos discontinuos de *Synechocystis minuscula* y *Limnothrix* sp.

En esta investigación se utilizó fracción soluble de crudo liviano LL-92 con la finalidad de determinar los posibles efectos de la concentración de la FSP sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de las cianobacterias *Synechocystis minuscula* y *Limnothrix* sp.

Las densidades celulares de los cultivos de *Synechocystis minuscula* expuestos a 10, 50 y 100% (V/V_0) de FSP fueron de 284.35 ± 17.92 ; 274.58 ± 6.57 y $288.29 \pm 13.09 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$ respectivamente. Esto significa que cuando la cianobacteria fue expuesta a 10 y 100% de la FSP se produjo un 4.57 y 3.25% de inhibición con respecto al control y una disminución significativa ($p < 0.05$) de 7.85% en los cultivos expuestos a 50% de la FSP (Fig. 4). Estos resultados indican que la fracción soluble de crudo disminuye muy levemente la densidad celular promedio.

Los resultados de crecimiento de *Limnothrix* sp. indican que la fracción soluble de petróleo no ejer-

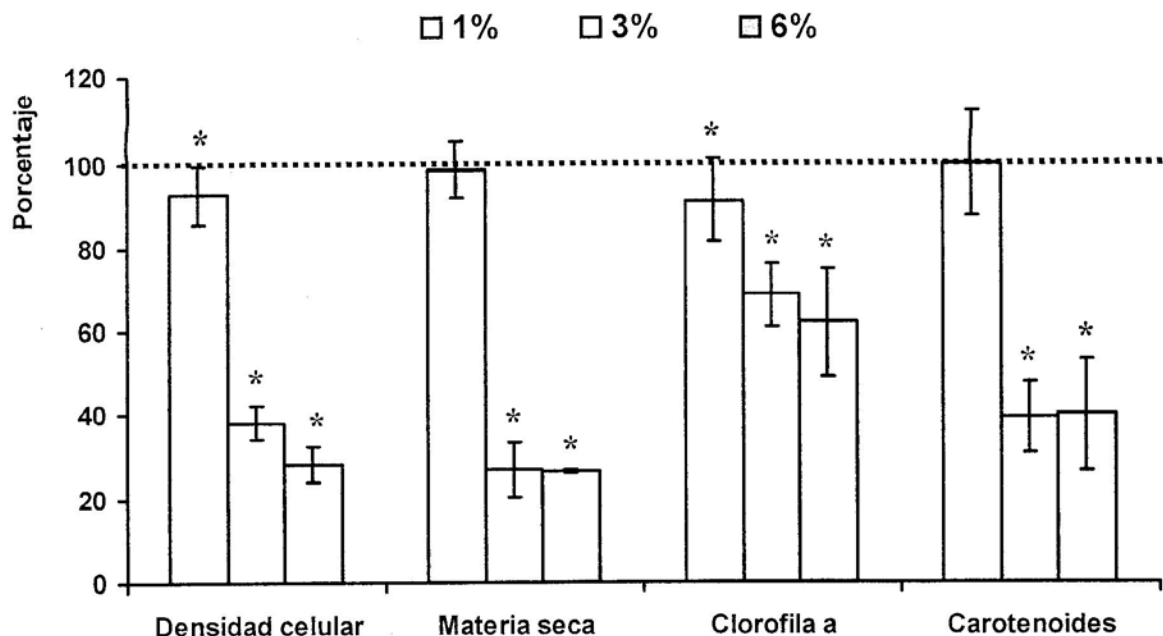


Figura 2. Respuesta del crecimiento y la producción de pigmentos de *Synechocystis minuscula* expuesta a 1, 3 y 6% de queroseno. Los valores de porcentaje fueron calculados con relación al control (100%). Las barras verticales indican el error estándar de la media y los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control.

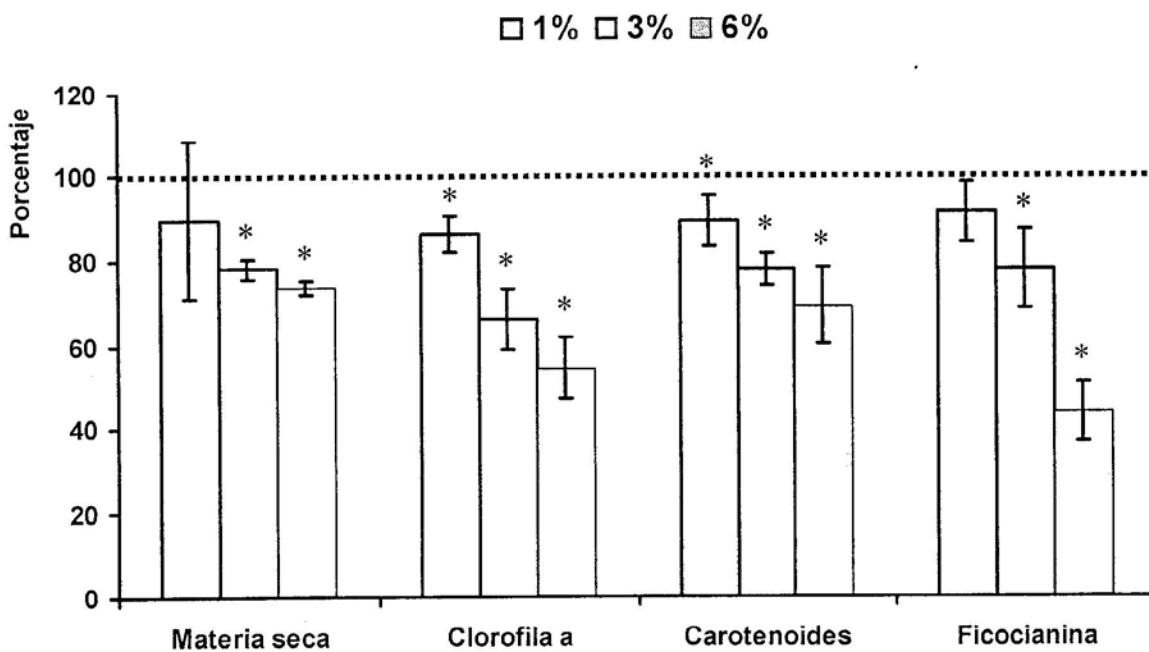


Figura 3. Respuesta del crecimiento y la producción de pigmentos de *Limnothrix* sp. expuesta a 1, 3 y 6% de queroseno. Los valores de porcentaje se calcularon con relación al control (100%). Las barras verticales indican el error estándar de la media y los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control.

ció un efecto inhibitorio significativo sobre los cultivos de estas cianobacterias. Los valores de absorbancia (DO_{750nm}) en fase estacionaria fueron de 0.827 ± 0.04 ; 0.871 ± 0.05 y 0.814 ± 0.03 en los cultivos con 10, 50 y 100% de FSP respectivamente, observándose que los cultivos expuestos FSP tienen densidades ópticas similares al control (0.831 ± 0.03).

En varios estudios se ha observado resistencia de microalgas y cianobacterias al efecto tóxico de FSP de compuestos hidrocarbonados. Phatarpekar y Ansari (2000), encontraron resultados similares a los obtenidos en este trabajo al utilizar FSP de queroseno. Estos autores no encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el crecimiento de la microalga *Tetraselmis suecica* expuesta a diferentes concentraciones de FSP. Fábregas y col. (1984) encontraron que la FSP obtenida de petróleo derramado por el tanquero "Urquiola" en las costas españolas no afectó el crecimiento de *Tetraselmis suecica* en ninguna de las concentraciones ensayadas, e incluso encontraron en algunos casos una ligera estimulación del crecimiento de esta microalga. Díaz (1983), reportó que *Platymonas* sp. fue tolerante a las distintas concentraciones de FSP de Crudo Maraven Liviano y no observó diferencias significativas en el crecimiento de este flagelado a las concentraciones de 50, 70 y 90% de FSP. Asimismo, Gordon y Prouse (1973), tampoco observaron ningún tipo de toxicidad de las fracciones solubles de los crudos Kuwait y South Louisiana sobre la diatomea *Thalassiosira pseudonana*. Diversos estudios han demostrado que las cianobacterias son más tolerantes que las microalgas al efecto de las FSP (Batterton y col., 1978; Silva, 1989).

No se observaron cambios significativos ($p < 0.05$) en el contenido celular de Clorofila *a* ni de carotenoides (determinados mediante espectrofotometría) en cultivos de *Synechocystis minuscula* expuestos a varias concentraciones de FSP. En otras palabras, la concentración de estos pigmentos en fase estacionaria es independiente de la concentración de FSP. Igual resultado se obtuvo en los ensayos con *Limnothrix* sp., en los que se observó que en fase estacionaria el contenido de pigmentos de clorofila *a*, carotenoides y ficocianina se mantuvo relativamente estable ($p > 0.05$).

Fábregas y col. (1984), encontraron que el contenido de Clorofila *a* en fase estacionaria de *Tetraselmis suecica* no se alteró por efecto de la FSP e incluso reportaron un ligero aumento de este pigmento. Estos autores también observaron un incremento de Clorofila *a* en presencia del dispersante SEAKLIN-101-NT a concentraciones mayores que 8 ppm. También se ha observado un ligero aumento en el contenido de Clorofila *a* con respecto a los controles en cultivos de *Cyclotella cryptica* y *Amphidinium carterae* con bajas concentraciones ($10 \mu\text{g l}^{-1}$) de crudo emulsionado en agua (Karydis 1982). Asimismo, Tukaj (1987) reportó que en cultivos de *Scenedesmus quadricauda* con extractos acuosos de $50 \text{ cm}^3 \text{ dm}^{-3}$ de crudo Libio Zueitina y combustible L-2, a partir del séptimo día de cultivo la estimulación de la síntesis de clorofila fue el doble del valor observado en el control.

En todos los tratamientos con FSP, la relación entre la concentración de clorofila *a* y la de carotenoides totales fue similar a la obtenida en el control. Jonte (2003), obtuvo resultados análogos en cultivos mixotróficos de *Synechocystis minuscula* con Acetato de Sodio. Este autor encontró que la síntesis de Clorofila *a* y de los carotenoides fue independiente de la concentración de acetato.

Los resultados de este experimento indican que las diferentes concentraciones de FSP no inhiben ni modulan significativamente el crecimiento celular ni el contenido de pigmentos y materia seca. En contraste, el Queroseno inhibió el crecimiento y redujo el contenido de pigmentos y la materia seca de las cianobacterias *Synechocystis minuscula* y *Limnothrix* sp. expuestas a este hidrocarburo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al CONDES y al FONACIT por la realización de este trabajo a través del financiamiento de los Proyectos 1992-99 y S1-2000000786, respectivamente.

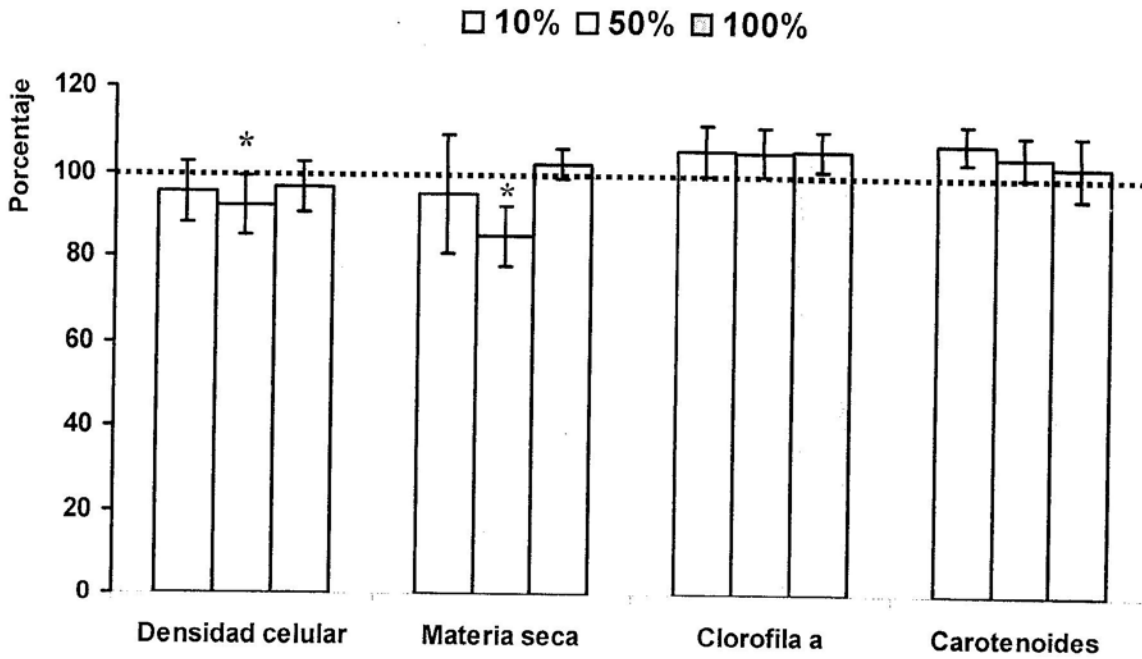


Figura 4. Respuesta del crecimiento y la producción de pigmentos de *Synechocystis minuscula* expuesta a 10, 50 y 100% de fracción soluble de petróleo (FSP). Los valores de porcentaje se calcularon con relación al control (100%). Las barras verticales indican el error estándar de la media y los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control.

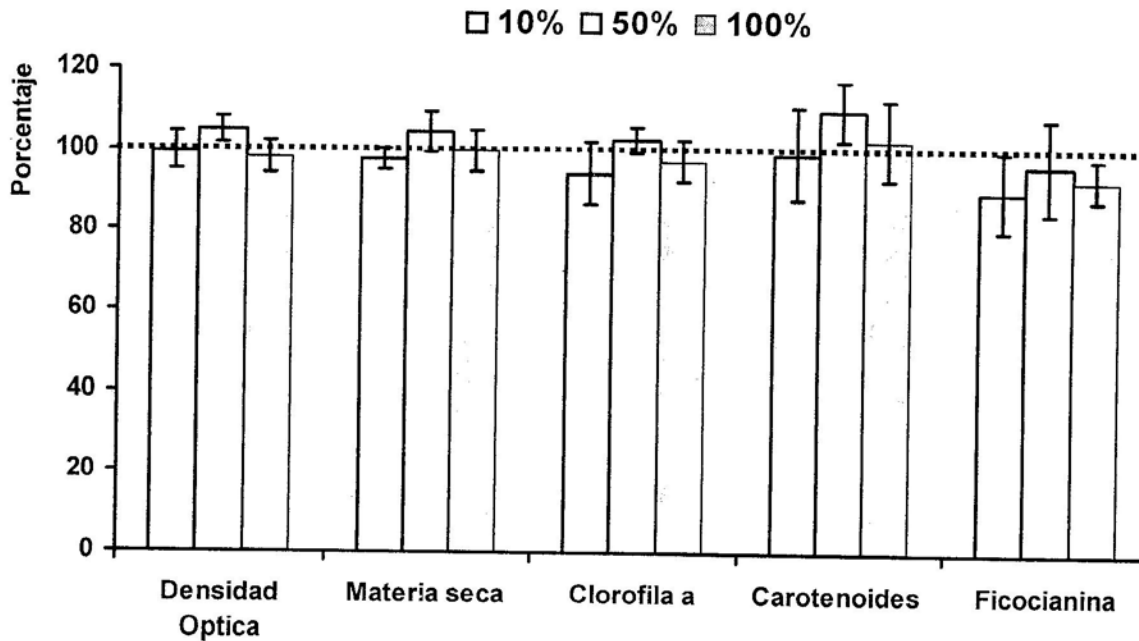


Figura 5. Respuesta del crecimiento y la producción de pigmentos de *Limnothrix sp.* expuesta a 10, 50 y 100% de fracción soluble de petróleo. Los valores de porcentaje fueron calculados con relación al control (100%). Las barras verticales indican el error estándar de la media y los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control.

LITERATURA CITADA.

- ARMSTRONG, J. Y. J. CALDER
1978. Inhibition of light-induced pH increase and O₂ evolution of marine microalgae by water-soluble components of crude and refined oils. *Applied Environmental Microbiology*, 35: 858-862.
- ARREDONDO, V., E. CORDERO, C. HERRERO Y J. ABALDE
1997. Manual de técnicas aplicadas a ficología. La Paz, Baja California Sur. México.
- BATTERTON, J., K. WINTERS Y C. VANBAALEN
1978. Analines: selective toxicity to blue-green algae. *Science*, 199: 1068-1070.
- BENNET, A. Y L. BOGORAD
1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green algae. *Journal of Cell Biology*, 58: 419-435.
- CLEMENTE, Y.
2000. Aislamiento y caracterización de la cianobacteria halotolerante *Limnothrix* sp, aislada del pozo de aguas de Salina Rica, Municipio Mara, Estado Zulia. (Tesis de Pregrado). Facultad Experimental de Ciencias LUZ. Maracaibo.
- CORNER, E.
1978. Pollution studies with marine plankton. Part I. Petroleum hydrocarbons and related compounds. *Advanced Marine Biology*, 15: 289-380.
- CREOLE PETROLEUM CORPORATION
1974. Study of the effects of oil discharges and industrial wastewaters on the fisheries of Lake Maracaibo, Venezuela. Research Report 212B00899. Battelle. Washington.
- DÍAZ, R.
1983. Crecimiento de *Bidulphia* sp. y *Platinomonas* sp. bajo los efectos de las fracciones solubles en el agua del petróleo. Instituto Oceanográfico, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- FÁBREGAS, J., J. ABALDE, C. HERRERO, B. CABEZAS Y M. VEIGA
1984. Growth of the marine microalga *Tretraselmis suecica* in batch cultures with different salinity and nutrient concentrations. *Aquaculture*, 42: 207-215.
- GAUR, J. Y H. KUMAR
1981. Growth response of four microalgae to three crude oils and furnace oil. *Environmental Pollution*, 25: 77-85.
- GORDON, D. Y N. PROUSE
1973. The effects of three oil on marine phytoplankton photosynthesis. *Marine Biology*, 22: 329-333.
- IGNATIADIS, L. Y N. MINICOS
1977. Ecological responses of phytoplankton to chronic oil pollution. *Environmental Pollution*, 13: 109-118.
- JONTE, L.
2003. Crecimiento de la cianobacteria *Synechocystis minuscula* en respuesta a diversos parámetros de cultivo. (Tesis de Pregrado). Facultad Experimental de Ciencias LUZ. Maracaibo. 104 p.
- KARYDIS, M.
1982. Toxicity of a photooxidised crude oil on two marine microalgae. *Botanica Marina*, 25: 25-29.
- LIEBE, B. Y H. FOCK
1992. Growth and adaptation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* on diesel exhaust particle extracts. *Journal of General Microbiology*, 138: 973 - 978.
- LEAHY, J. Y R. COLWELL
1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, 54: 305-315.
- MARKER, A., E. NUSCH, H. RAI, Y B. RIEMANN
1980. The measurement of photosynthetic pigments in freshwater and standardization of methods: conclusions and recommendations. *Archives of Hydrobiology Bulletin (Ergebnisse der Limnologie)* 14: 91-106.
- MEGHARAJ, M., I. SINGLETON, N.C. MCCLURE, Y R. NAIDU
2000. Influence of petroleum hydrocarbon contamination on microalgae and microbial activities in a long-term contaminated soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 38: 439-45.
- MIRONOV, O.
1968. Hydrocarbon pollution of the sea and its influence on marine organisms. *Helgoländer wiss Meeresuntersuch*, 17: 335-339.
- MORALES-LOO, M. Y M. GOUTX
1990. Effects of water-soluble fraction of the Mexican crude oil "Isthmus Cactus" on growth, cellular content of chlorophyll *a*, and lipid composition of planktonic microalgae. *Marine Biology*, 104: 503-509.
- O'BRIEN, P. Y P. DIXON
1976. The effects of oils and oils components on algae: a review. *British Phycology Journal*, 11: 115-142.
- O'SULLIVAN, A. Y T. JACQUES
2001. Impact reference system effects of oil in the marine environment: impact of hydrocarbons on fauna and flora. European Commission Directorate, General Environment Civil Protection and Environmental Accidents. Brussels, Belgium. <http://www.europa.eu.int/comm/environment/civil/index.htm>.
- PHATARPEKAR, P. Y Z. ANSARI
2000. Comparative toxicity of water soluble fractions of four oils on growth of a microalgae. *Botanica Marina*, 43: 367-375.

PERONA, E.

1995. Cianobacterias epilíticas y calidad del agua del río Albarche a su paso por la comunidad de Madrid. (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Madrid. España. 333 p.

SILVA, S.

1989. Efecto de las fracciones hidrosolubles del petróleo sobre el crecimiento y asimilación fotosintética de microalgas del Lago de Maracaibo. (Tesis de Pregrado). Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo. 110 p.

SOTO, C.; J. HELLEBUST Y T. HUTCHINSON

1975. The effect of aqueous extracts of crude oil and naphthalene on the physiology and morphology of a freshwater green alga. *Verh. International Verein. Limnology*, 19: 2145-2154.

STRICKLAND, J. Y T. PARSONS

1972. *A practical handbook of seawater analysis*. Bulletin 167 (2th Edition), Fisheries Research Board of Canada, Ottawa.

TUKAJ, Z.

1987. The effects of crude and fuel oils on the growth, chlorophyll a content and dry matter production of a green alga *Scenedesmus quaricauda* (Turp.) bréb. *Environmental Pollution*, 47: 9-24.

TUKAJ, Z. Y J. BOHDANOWICZ

1995. Diesel-fuel-oil induced morphological changes in some *Scenedesmus* species (Chlorococcales). *Algological Studies*, 77: 83-94.

UTTING, S. D.

1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquaculture*, 56: 123-138.

VANDERMEULEN, J. Y T. AHERN

1976. Effect of petroleum hydrocarbons on algal physiology: review and progress report. Pp. 107-125. En: Carr, N. G. (ed.): *Effects of pollutants on aquatic organisms*. SEB, Cambridge University Press, Cambridge.

VESTAL, R., J. COONEY, J. Y S. CROW

1984. The effects of hydrocarbons on aquatic microorganisms. Pp. 476-505. En: R. M. Atlas (ed.): *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Co., New York.

VILLAMAR, F.

1996. Bioensayo de toxicidad (CL₅₀) del dispersante de petróleo BP 1100 WD con fitoplancton marino (*Tetraselmis* sp). *Acta Oceanográfica del Pacífico*, 8: 67-73.