



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Celular y Molecular

Área de Microbiología

**Estudio de los efectos tóxicos del plomo sobre la
microalga marina 'Tetraselmis suecica'**

**Estudo dos efectos tóxicos do chumbo sobre a
microalga mariña 'Tetraselmis suecica'**

**Study of the toxic effects of lead on the marine
microalgae 'Tetraselmis suecica'**

Alba Ares González

Trabajo de fin de grao

Fecha de defensa: 27 de junio de 2016

Dirigido por Dtor. Enrique Torres Vaamonde.



El presente trabajo de Fin de Grado ha sido realizado en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña, bajo la dirección de Enrique Torres Vaamonde, Profesor de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña.

Índice

Resumen / Resumo / Abstract	1
1. Introducción	3
2. Objetivo	5
3. Materiales y métodos	6
3.1. Descripción de la especie de microalga utilizada	6
3.2. Descripción del contaminante utilizado	7
3.3. Cultivo microalgal y diseño experimental	8
3.4. Recuento celular y cálculo de la tasa de crecimiento (μ)	9
3.5. Determinación de pigmentos mediante espectrofotometría	10
3.6. Determinación de fitoquelatinas	11
3.8. Análisis estadísticos	12
4. Resultados y discusión	13
4.1. Densidad y crecimiento celular	13
4.3. Determinación de pigmentos	16
4.4. Determinación de fitoquelatinas	18
5. Conclusiones / Conclusións / Conclusions	19
6. Bibliografía	20

Resumen.

En el medioambiente se produce la entrada de metales pesados no esenciales como el plomo. Lo que podría tener un impacto negativo en la comunidad microalgal, de quien depende la mayor parte de la producción primaria de los ecosistemas acuáticos.

En el presente trabajo se estudió el efecto tóxico del plomo sobre la microalga marina *Tetraselmis suecica*, donde los cultivos se expusieron a concentraciones de 1 ; 5 ; 10 ; 15 y 30 mg L⁻¹ de Plomo durante 96 h y se analizaron los parámetros de crecimiento, contenido celular de pigmentos (clorofila *a*, clorofila *b* y carotenos) y producción de fitoquelatinas. Los resultados obtenidos mostraron que el plomo presenta efectos nocivos significativos ($p < 0,05$) en todos los parámetros de crecimiento y producción de pigmentos, y un efecto estimulador en la producción de fitoquelatinas, como mecanismo de defensa.

Palabras clave: Plomo, *Tetraselmis suecica*, microalga, pigmentos, densidad celular, fitoquelatinas.

Resumo.

No medioambiente prodúcese a entrada de metais pesados como o chumbo, onde bioacumulácese. Isto podería ter un impacto negativo sobre a comunidade de microalgal, da cal depende a maior parte da produción primaria dos ecosistemas acuáticos.

No presente traballo, estudase o efecto tóxico do chumbo na microalga mariña *Tetraselmis suecica*, que a concentracións de 1 ; 5; 10; 15 e 30 mg L⁻¹ de chumbo durante 96 h e foron analizados os parámetros de crecemento, o contido da celular de pigmentos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenos) e produción de fitoquelatinas. Os resultados mostraron que o chumbo presentan efectos adversos significativos ($p < 0,05$) nos parámetros de crecemento e produción de pigmento, e presentan un efecto estimulador sobre a produción de fitoquelatinas, como un mecanismo de defensa.

Palabras clave: Plomo, *Tetraselmis suecica*, microalga, pigmentos, crecemento celular, fitoquelatinas.

Abstract.

In the environment the entrance of heavy metals such as lead, where bioaccumulate occurs. This could have a negative impact on the microalgal community, which oversees most of the primary production of aquatic ecosystems.

In this study, we study the toxic effect of lead on marine microalgae *Tetraselmis suecica*. The crops of *Tetraselmis suecica* were exposed to concentrations of 1 ; 5 ; 10; 15 and 30 mg L⁻¹ for 96 h Lead. Were analyzed growth parameters, the content of cellular pigment (chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenes) and phytochelatin production. The results showed that the lead does present significant adverse effects (p <0.05) in all parameters of growth and content of cellular pigment, and stimulatory effect on the production of phytochelatin, as a defense mechanism.

Keywords: Lead, *Tetraselmis suecica*, microalgae, pigments, cell density, phytochelatin.

1. Introducción.

Como consecuencia de la revolución industrial, se produce un aumento de las emisiones antropogénicas de contaminantes en el medio ambiente (Kampa & Castanas, 2008), como es el caso de los metales pesados. Los metales pesados son contaminantes muy persistentes en ambientes acuáticos. Esto es debido a que no se descomponen y, por lo tanto se acumulan en los sedimentos, y posteriormente pueden ser liberados lentamente al agua haciéndose disponibles para los organismos (Bryan *et al.* 1992).

El ciclo del plomo se ha visto afectado por medio de la acción antropogénica, debido a procesos industriales y a la combustión del petróleo, produciendo diversos peligros (Jarup, 2003). Durante décadas la principal fuente de emisión de este contaminante fueron los vehículos a motor de combustión (Magee *et al.*, 1973), pero la reducción ó eliminación del contenido de plomo de las gasolinas ha contribuido a bajar los niveles de emisión considerablemente (Chen *et al.*, 2005; Magaril, 2016). Hoy en día el problema de la contaminación por plomo se centra en torno a industrias siderometalúrgicas, manufacturas de baterías y acumuladores u otras fuentes puntuales de emisiones de plomo. La emisión está reglamentada en la Directiva 1999/30/CE, con sus valores límite correspondientes y transpuesto a la legislación nacional en el R.D. 1073/2002. Que establece un valor límite anual para este contaminante de $0.5 \mu\text{g m}^{-3}$. Otro problema es que el plomo es un metal que se acumula próximo en el entorno a su fuente de emisión (Gomez-Alvarez *et al.*, 2009).

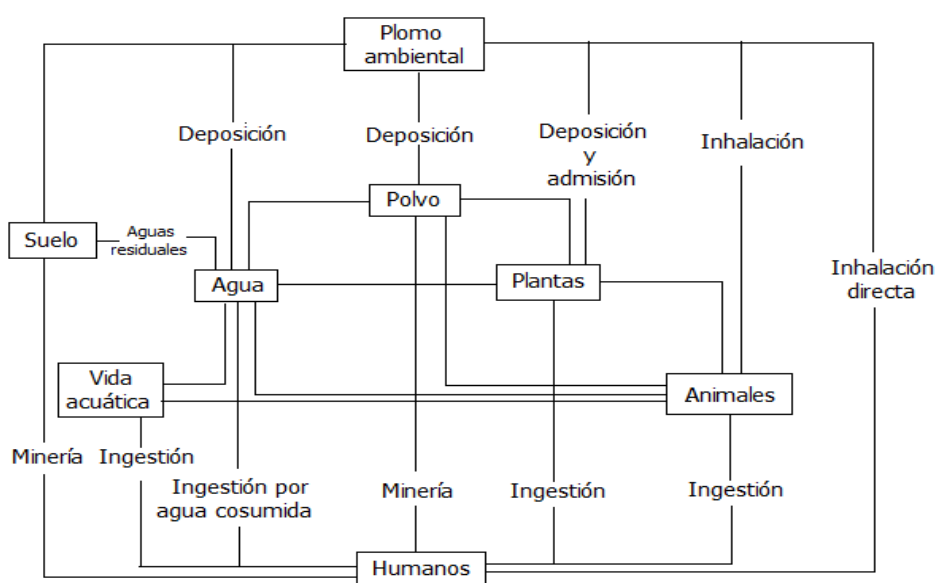


Figura 1. Esquema circulación del Plomo (Capo, 2002).

En mamíferos al entrar en el organismo el plomo es absorbido por los glóbulos rojos, por lo que se produce su dispersión por el organismo, pudiéndose concentrar en los riñones y en el hígado. Posteriormente afecta al sistema nervioso y comienza su acumulación en los dientes y el tejido óseo con los riesgos que ello conlleva (Caprio *et al.*, 1974 ; Needleman, 2004).

Las microalgas, al pertenecer a un grupo de organismos autotótrofos, se caracterizan por presentar una gran diversidad y sensibilidad a los cambios ambientales (Stauber & Davies, 2000). Por lo que durante mucho tiempo se han utilizado como organismos indicadores de la calidad del agua (Blaise, 1993). Por lo que cualquier agente químico que altere la comunidad microalgal y/o su producción primaria, tendrá como consecuencia desequilibrios en niveles tróficos superiores, generando graves consecuencias en los ecosistemas (Franklin *et al.*, 2000).

Se ha observado la toxicidad ejercida por los metales pesados (Liua *et al.*, 2011), en especial el plomo (Wood, 1976; Cordero *et al.*, 2005) y también su bioacumulación (Debeliusa *et al.*, 2009) en la comunidad microalgal, que se encuentra presente en la mayoría de ambientes (Borowitzka, 1988). Afectando de esta manera a otros niveles de la cadena trófica de los ecosistemas acuáticos (Goretti *et al.*, 2016) de los cuales depende la producción primaria producida por la comunidad microalgal (Yap *et al.*, 2004), por lo que las microalgas constituyen la principal entrada de energía en el ecosistema. Estos microorganismos son fundamentales por su capacidad para captar luz, transformarla en energía que sería utilizada para la asimilación de dióxido de carbono (CO₂) y otros nutrientes a su biomasa, formando así el primer eslabón de la cadena trófica (Soto-Jimenez *et al.*, 2011).

Las microalgas, como muchos organismos, han desarrollado diferentes mecanismos de tolerancia a la toxicidad por metales (Perales-Vela *et al.*, 2006). En respuesta a la absorción excesiva de metales, las microalgas inducen la producción de péptidos que se unen al metal, conocidos como las metalotioneínas clase III o fitoquelatinas (Gekeler *et al.*, 1988) . Varios estudios han confirmado la síntesis de fitoquelatinas en respuesta al cadmio y a otros metales pesados en microalgas (Robinson, 1989). Por lo que diversos estudios defienden la utilización de las microalgas como mecanismo de absorción de la contaminación ambiental (Monteiro *et al.*, 2012), cuando esta es baja gracias a mecanismos de detoxificación.

2. Objetivo.

Se plantea como objetivo principal del presente trabajo, examinar los posibles efectos tóxicos del plomo sobre la microalga marina *Tetraselmis suecica*. Este objetivo se llevara a cabo mediante la determinación del efecto que este metal tiene a nivel del crecimiento, determinación de la concentración que producen el 50% de inhibición (EC_{50}), el contenido en pigmentos fotosintéticos y del contenido de fitoquelatinas de esta microalga.

3. Materiales y métodos.

• Descripción de la especie de microalga utilizada

En el estudio realizado se empleó la especie de microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch, una especie unicelular que se caracteriza por su amplia presencia mundial y su color verde, debido a la presencia de clorofila *a* y *b*, que presenta una forma oval con 4 flagelos isodinámicos que salen de una invaginación apical que se observa en la porción anterior de la célula y que está ubicada en la misma dirección en la que avanza. Su tamaño celular se ha determinado por granulometría láser resultando su longitud media en 8 micrómetros (Morineau *et al.*, 2001) mientras que su diámetro oscila entre 10 – 15 micrómetros.

Su reproducción consiste en una división celular binaria, momento en el que las células pierden su estado móvil, y las dos células hijas ya están completamente flageladas antes de la liberación de la teca (Butcher, 1959).

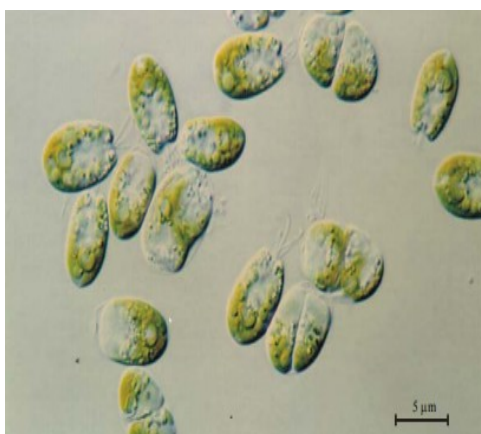


Figura 1. Microfotografía de *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch.

Se considera que *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher es el flagelado marino más fácil de cultivar a gran escala, por eso es una de las especies más utilizadas en acuicultura. Se emplea como alimento para larvas de moluscos, crustáceos y peces, gracias principalmente a que proporciona una fuente muy atractiva de ácidos grasos de cadena larga (Fábregas *et al.*, 2001). Además de esta utilidad, su fácil cultivo y manipulación permite su uso para la producción de metabolitos de interés comercial, como por ejemplo el biodiesel (Rodolfi *et al.*, 2009).

- **Descripción del contaminante utilizado.**

El plomo es un metal pesado, que es tóxico para diversos tipos de organismos (Bryan, 1971). El plomo forma diversos compuestos como sales, óxidos y compuestos organometálicos. Debido a su uso industrial, hoy en día el plomo se puede encontrar dentro de cada uno de nuestros cuerpos a niveles muy superiores a los que había en la antigüedad (Smith *et al.*, 1995), y a niveles que causan efectos adversos en la salud (Budd *et al.* 1998). En el presente trabajo se utilizó como fuente de plomo Cloruro de plomo (II), mediante la cual se preparó una disolución "stock" de plomo, filtrado en condiciones estériles, que tiene una concentración de 1 g L⁻¹. A partir de esta disolución se preparan las diferentes concentraciones usadas en los experimentos.

• Cultivo microalgal y diseño experimental.

Tetraselmis suecica se cultiva en agua de mar que se esteriliza con anterioridad en un autoclave a 121 °C, durante 20 minutos. La fuente de nutrientes utilizada es el medio conocido como Algal-1 (Fábregas, 1984).

Se realizó un cultivo "Stock" en botellas Pyrex de 1L al que se añadió el inóculo adecuado de microalgas y se mantuvo en la cámara de cultivo bajo unas condiciones controladas de temperatura e iluminación, procediendo a la renovación del cultivo dos veces a la semana, mediante la extracción de una cantidad del cultivo para sustituirla por agua y la cantidad correspondiente de medio Algal-1.

La temperatura de la cámara de cultivo se mantiene constante a 18 ± 1 °C y la iluminación artificial se aplica en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con una intensidad de $68,25 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ proporcionada por tubos fluorescentes Philips TLD de 36 W. El aire inyectado a los cultivos es filtrado mediante filtros Millipore FG de $0,20 \mu\text{m}$ de tamaño de poro para evitar la contaminación del cultivo.

Con el fin de evaluar posibles efectos tóxicos ejercidos por el plomo sobre diferentes parámetros relacionados con el crecimiento de la microalga marina *Tetraselmis suecica*, se realizaron experiencias de 96 horas de duración. Las experiencias se realizaron en botellas pyrex de 200 ml, repitiendo 3 veces cada una de las concentraciones seleccionadas que fueron 1 mg L^{-1} , 5 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1} , 15 mg L^{-1} , 30 mg L^{-1} . Además de realizar el control en el que el contaminante está ausente. Estos cultivos se mantuvieron en la cámara de cultivo en las mismas condiciones que el cultivo "stock" inicial pero en ausencia de aireación, para realizar la toma de muestras para la determinación de los parámetros descritos en los siguientes apartados.

• Recuento celular y cálculo de la tasa de crecimiento (μ).

La densidad celular se determinó mediante el recuento celular directo al microscopio, utilizando una cámara *Neubauer* y un microscopio óptico de contraste de fases *NIKON Labophot* con un objetivo de 40x. Se toma una muestra de cada tubo y se fija las células con 10 μ L de Lugol, para evitar que se muevan sin llegar a romper las células, ya que son flageladas. En el caso de que haya muestras muy concentradas se realizan las diluciones necesarias.

A partir de estos datos se calcula la tasa de crecimiento (μ) para el tiempo de 96h utilizando la siguiente ecuación:

$$\mu = [\ln(N_f) - \ln(N_0)] / \ln 2 (t_f - t_0)$$

En esta fórmula μ representa la tasa de crecimiento que se expresa en días⁻¹. (t_0) y (t_f) son respectivamente el tiempo inicial y final del periodo estudiado y ambos son expresados en días. (N_f) y (N_0) representan la densidad celular (células·mL⁻¹) en dichos tiempos.

A partir los datos de densidad celular, se calcula el porcentaje de inhibición del crecimiento de *T. suecica*:

$$\% \text{ inhibición} = ((C - T)/C - 40 \cdot 10^{-4}) \cdot 100$$

donde, C y T son el número de células por mL⁻¹ del control y de cada tratamiento con diferentes concentraciones del plomo, respectivamente. Siendo $40 \cdot 10^{-4}$ el recuento celular del que partimos.

La concentración efectiva media (EC_{50}), es decir la concentración de la sustancia estudiada que provoca una disminución del crecimiento del 50% con respecto al control, se obtiene mediante la interpolación gráfica en las curvas de concentración–respuesta. Los datos para obtener la EC_{50} se ajustan mediante una regresión no lineal, usando una curva logística. El cálculo de la EC_{50} se lleva a cabo a las 96 horas.

- **Determinación de pigmentos mediante espectrofotometría.**

Para la determinación de pigmentos se retira un volumen igual de todos los cultivos y se centrifuga a 4500 r.p.m durante 15min a 4 °C.

Tras esto se retira el sobrenadante con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vaciado y el pellet de células se almacena en el congelador a -80 °C. Tras obtener todas las muestras del ensayo se descongelan a temperatura ambiente y se resuspende en una solución de acetona 90%, porque es el solvente requerido para la aplicación de las ecuaciones propuestas por Jeffrey & Humphey (1975) para las clorofilas y los carotenos en microalgas. Posteriormente se realiza una breve sonicación, para asegurar la completa extracción de los pigmentos. Las muestras se mantiene en oscuridad a 4 °C un mínimo de 24 h. Pasado este tiempo se centrifugan nuevamente y esta vez se recoge el sobrenadante que contiene los pigmentos, descartando los restos celulares.

Utilizando un espectrofotómetro *Shimadzu UV-1700*, se mide la absorbancia a tres longitudes de onda, 664, 647 y 480nm, utilizando como blanco la solución de acetona al 90%. Estas ecuaciones son las utilizadas para el cálculo de las concentraciones de pigmentos extraídos de cada muestra:

$$\text{Clorofila } a = 11,93 A_{664} - 1,93 A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b = 20,36 A_{647} - 5,5 A_{664}$$

$$\text{Carotenoides totales} = 4 A_{480}$$

A664, A647 y A480 representan las absorbancias medidas a 664, 647 y 480nm, respectivamente y la concentración de cada pigmento es expresada en $\mu\text{g mL}^{-1}$.

• **Determinación de fitoquelatinas.**

Para la determinación de fitoquelatinas se retira un volumen igual de todos los cultivos y se centrifuga a 4500 r.p.m. durante 15 min a 4 °C.

Tras esto se retira el sobrenadante con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío y el pellet de células se resuspende en agua de mar filtrada y estéril, y se vuelve a centrifugar a 4500 r.p.m. durante 15min a 4 °C, y se vuelve a retirar el sobrenadante con una pipeta Pasteur. A continuación se almacenan solo los pellet de las muestras en un congelador a -80 °C.

Tras obtener todas las muestras del ensayo se descongelan a temperatura ambiente y se resuspende el HCL 0,01 M. Tras esto se realiza una sonicación de 4 min (con una pausa de 30 s) de cada tubo para asegurar la completa extracción del contenido celular. Pasado este tiempo se centrifugan nuevamente a 13.000 r.p.m. y esta vez se recoge el sobrenadante que contiene las proteínas, descartando los restos celulares.

Utilizando un espectrofotómetro *Shimadzu UV- 1700*, se mide la absorbancia a longitud de onda de 412 nm, de todas las muestras 2 veces , la primera medición se realiza mezclando la muestra con tampón fosfato y la segunda medición se realiza mezclando la muestra con el reactivo propuesto por Ellman (1959). En ambos casos el blanco se realiza sustituyendo la cantidad de muestra por HCL 0,01 M, y añadiendo la misma cantidad de tampón fosfato o reactivo Ellman respectivamente .

Se obtiene la absorbancia real mediante la diferencia de la absorbancia que no contiene reactivo Ellman menos la que si que lo contiene. Posteriormente se realiza una recta de calibrado con glutatión para así obtener la concentración de fitoquelatinas.

• **Análisis estadísticos**

A partir de los resultados obtenidos, se calculan las medias y las desviaciones estándar de cada tratamiento y de los controles para todos los parámetros analizados. Para el tratamiento estadístico de los datos, se utiliza el programa IBM SPSS Statistics versión 19.0.0. Para cada experiencia realizada, se lleva a cabo un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) a un nivel de confianza del 95%, para analizar la hipótesis de que la concentración de plomo del medio no afecta al parámetro de estudio. En los casos en que esta hipótesis se rechace, se empleará el test de rango múltiple de Tukey, a un nivel de significación de 0,05 ($p < 0,05$), para analizar de qué forma afecta las diferentes concentraciones de plomo al parámetro estudiado. Las gráficas se realizan con el paquete de análisis estadístico y de gráficas avanzadas SigmaPlot versión 13.0. Tanto en las tablas como en las figuras, los resultados se expresan como la media de los valores obtenidos \pm desviación estándar.

4. Resultados y discusión.

4.1 Densidad y crecimiento celular.

El crecimiento de *T. suecica* se ve negativamente afectado por la presencia de plomo en el medio de cultivo, tal y como reflejan las curvas de crecimiento de los cultivos microalgales expuestos a las distintas concentraciones de plomo (Figura 2).

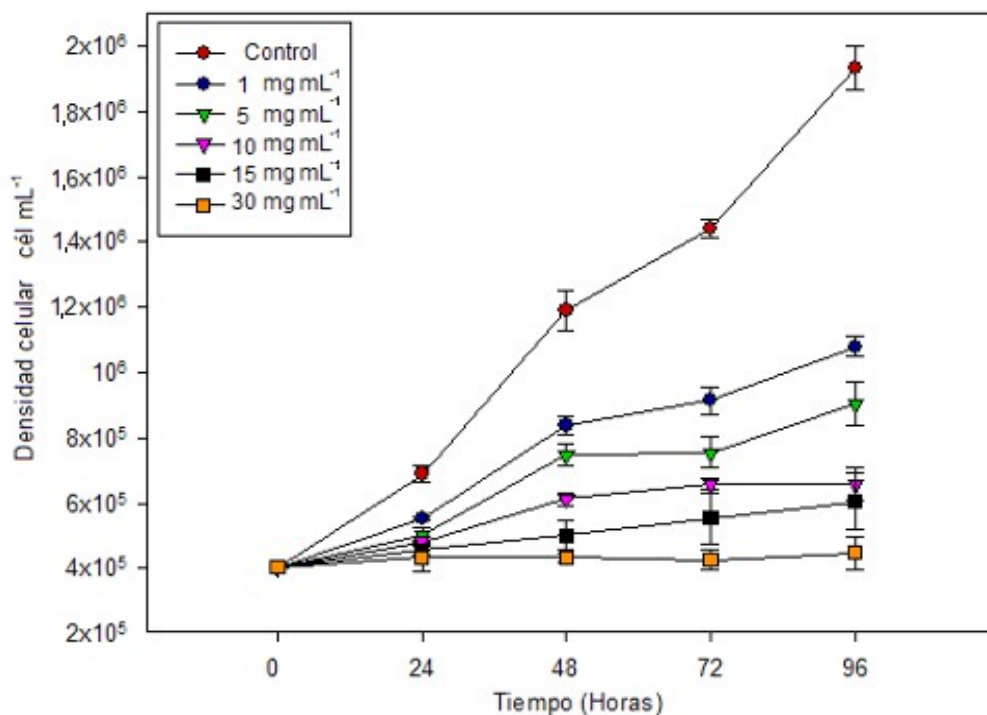


Figura 2. Curvas de crecimiento de los cultivos de *T. Suecica* en ausencia (Control) y presencia de distintas concentraciones de plomo. Los valores representados se corresponden con la media de las tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar.

Este efecto tóxico se observa ya desde las 24 h de exposición y va aumentando hasta las 96 h. La concentración más alta de plomo ensayada (30 mg L⁻¹) inhibe por completo el crecimiento en todo el periodo de estudio, ya que se obtienen densidades celulares finales 45,58x10⁴, en el cultivo 30 mg L⁻¹ a las 96 h, cuando hemos partido de un inóculo de 40x10⁴ células mL⁻¹.

A las 96 h, existen diferencias significativas en la densidad celular final alcanzada en los diferentes cultivos respecto al control ($p < 0.05$). Por tanto, todos los cultivos presentan diferencias entre sí ($p < 0.05$), con excepción de los cultivos de 10 mg L⁻¹ y 15 mg L⁻¹. Al comparar por grupos se obtiene la siguiente ordenación en cuanto a la toxicidad del plomo sobre el crecimiento:

$$\text{Control} < 1 < 5 < 10 = 15 < 30$$

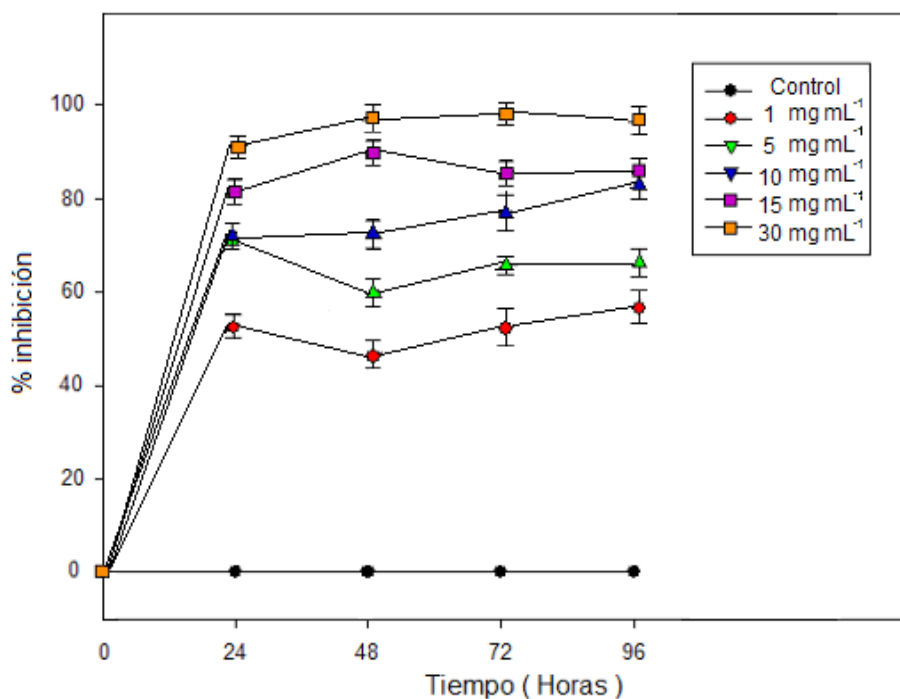


Figura 3. Inhibición del crecimiento producido por los distintos tratamientos, considerando el crecimiento del control como el 100%. Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar.

El descenso de la densidad es dependiente de la concentración, de modo que cuanto mayor es la concentración de plomo en el medio de cultivo mayor es la inhibición del crecimiento (Figura 3).

Cultivo	Densidad celular (96 h)	Tasa crecimiento (día ⁻¹)
Control	$1,94 \times 10^8 \pm 4,06 \times 10^4$	$0,564 \pm 0,007$
1 mg L⁻¹	$1,08 \times 10^8 \pm 2,2 \times 10^4$	$0,355 \pm 0,007$
5 mg L⁻¹	$9,04 \times 10^5 \pm 6,8 \times 10^3$	$0,291 \pm 0,002$
10 mg L⁻¹	$6,61 \times 10^5 \pm 9,8 \times 10^3$	$0,175 \pm 0,003$
15 mg L⁻¹	$6,07 \times 10^5 \pm 3,8 \times 10^4$	$0,146 \pm 0,001$
30 mg L⁻¹	$4,48 \times 10^5 \pm 5,4 \times 10^3$	$0,037 \pm 0,004$

Figura 4. Densidades celulares y tasas de crecimiento de los cultivos expuestos a diferentes concentraciones de plomo tras 96 horas. Los valores representados son la media de las tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar.

La figura 4 muestra la densidad celular y la tasa de crecimiento a 96 h de cultivo calculada tal y como se indica en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos. La tasa de crecimiento a las 96 horas disminuye significativamente con respecto al control en los cultivos de concentraciones iguales o superiores a 10 mg L⁻¹ de plomo ($p < 0.05$).

La EC_{50} para el crecimiento (concentración efectiva) después de una exposición de 96 h al plomo fue de 8,23 mg L⁻¹. Es decir, 8,23 mg L⁻¹ es la concentración de plomo que provoca una disminución del crecimiento del 50 % con respecto al control. Algunos Valores de EC_{50} descritos para el plomo en microalgas en estudios anteriores varían desde 37.8 mmol L⁻¹ en un ensayo con *Isochrysis galbana* (Liua *et al.* 2011) a 2,6 mg L⁻¹ en un ensayo con *Tetraselmis chuii*. (Debeliusa *et al.*, 2009).

El crecimiento es uno de los parámetros más utilizados para estudiar los efectos de compuestos tóxicos sobre las microalgas en los ensayos de toxicidad crónicos (van Wezel & van Vlaardingen, 2004). La toxicidad a metales pesados en numerosos ensayos se mide en función de la reducción de la tasa de crecimiento o de la biomasa final, en relación a un control (Cordero *et al.*, 2005; Debeliusa *et al.*, 2009). Diversos estudios demuestran que el crecimiento es uno de los parámetros más sensible dentro de los estudiados (Franklin *et al.*, 2001a; Strom *et al.*, 2009). Por lo contrario hay estudios en los que se concluye que este parámetro es menos sensible que otros como la producción fotosintética. Esto es debido a que la inhibición del crecimiento refleja un valor medio de la población estudiada sin tener en cuenta la respuesta a nivel celular (Geoffroy *et al.*, 2007), ya que el crecimiento es un parámetro que puede ver afectada su sensibilidad dependiendo del tipo de organismo, de la especie o del contaminante.

4.2 Determinación de pigmentos.

Los marcadores bioquímicos, como los pigmentos, son frecuentemente utilizados para la monitorización de la contaminación en ambientes acuáticos. Concretamente, los marcadores bioquímicos son seleccionados entre los procesos moleculares mas rápidos que tienen lugar en respuesta a los efectos toxicológicos de los principales contaminantes (Banni *et al.*, 2005), ya que los metabolitos presentes en la célula son los productos finales de procesos regulatorios celulares, y sus niveles se pueden considerar como la respuesta de los sistemas biológicos a los cambios ambientales (Jamers *et al.*, 2009).

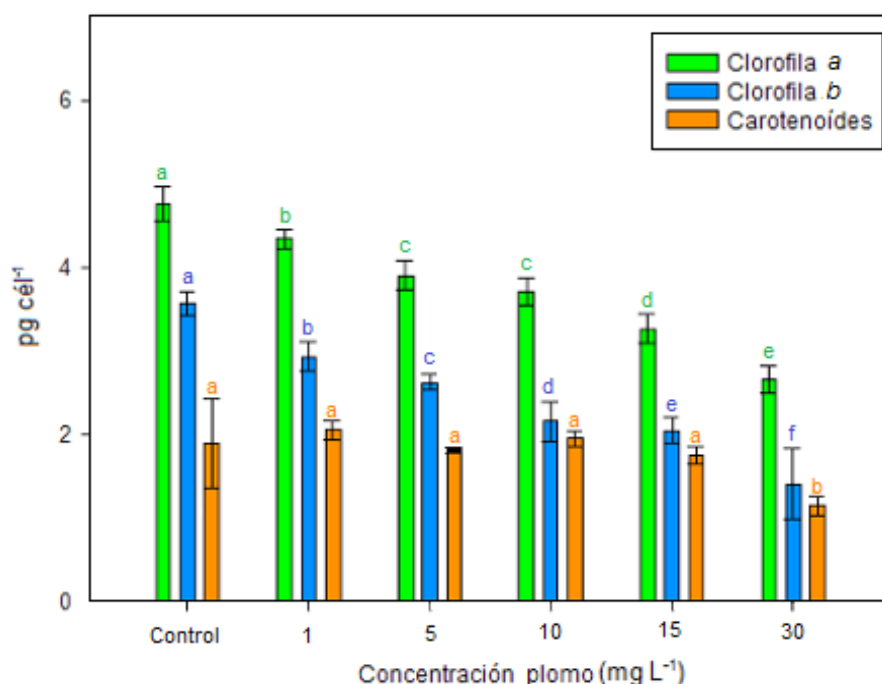


Figura 5. Contenido celular de pigmentos, expresado en pg·célula⁻¹, de la microalga *T. suecica* tras su exposición durante 96h a diferentes concentraciones de plomo. Las letras indica las diferencias entre los diferentes grupos utilizando el test de Tukey.

La concentración celular de pigmentos, tanto de clorofila *a* como de clorofila *b* y carotenoides, se ve afectada significativamente ($p < 0,05$) por la presencia de plomo (Fig.5), en el medio con concentraciones mas elevadas de plomo (a partir de 10 mg·L⁻¹). Al comparar por grupos se obtiene la siguiente ordenación en cuanto a la toxicidad del plomo sobre la producción de cada pigmento:

Clorofila *a* : **Control < 1 < 5 = 10 < 15 < 30**

Clorofila *b* : **Control < 1 < 5 < 10 < 15 < 30**

Carotenoides: **Control = 1 = 5 = 10 = 15 < 30**

El contenido en clorofilas *a* y *b* se ha descrito como el índice ideal para evaluar el efecto de los contaminantes sobre las microalgas en las tasas fotosintética y respiratoria (Xu *et al.*, 2013).

El efecto negativo del plomo sobre el contenido en pigmentos de *Tetraselmis suecica* (pg cél⁻¹) fue dependiente de concentración. El contenido de clorofila *a* fue máximo en el control ($4,75 \pm 0,202$ pg cél⁻¹) y disminuyó hasta su valor mínimo en los cultivos con mayor concentración del metal ($2,66 \pm 0,168$ pg cél⁻¹). Con el contenido de clorofila *b* ocurrió lo mismo: la concentración de este pigmento disminuyó desde los controles ($3,56 \pm 0,144$ pg cél⁻¹), hasta su mínima concentración en los cultivos con 30 mg L⁻¹ de plomo ($1,41 \pm 0,427$ pg cél⁻¹). El mayor contenido en carotenoides lo presentaron los cultivos control, 1, 5y 10 mg L⁻¹ ($1,93 \pm 0,538$; $2,05 \pm 0,114$; $1,94 \pm 0,036$; $1,95 \pm 0,298$ pg cél⁻¹, respectivamente) , y el mínimo, los cultivos con 15 y 30 mg L⁻¹ del compuesto ensayado ($1,75 \pm 0,093$; $1,14 \pm 0,117$ pg cél⁻¹).

En microalgas, como la pérdida de clorofilas está asociada a estrés ambiental (Hendry & Price, 1993), el contenido de pigmentos es utilizado frecuentemente como biomarcador de la exposición a diversos tóxicos como los metales pesados (Couderchet & Vernet, 2003). Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que tras 96 horas de exposición al plomo el contenido celular de los diferentes pigmentos fotosintéticos de *Tetraselmis suecica* se reduce significativamente en las concentraciones mas elevadas (15 y 30 mg L⁻¹), con respecto al observado en las células de los cultivos control (Fig. 5).

4.3 Determinación de Fitoquelatinas.

Un parámetro estudiado en algunos ensayos de toxicidad a metales pesados en microalgas es el contenido celular en metalotioneínas o fitoquelatinas (Perales-Vela *et al.*, 2006), debido a la capacidad de destoxificación que poseen, ya que las fitoquelatinas son capaces de secuestrar metales, impidiendo que estos actúen sobre las dianas celulares (Gekeler *et al.*, 1988).

Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores celulares de producción de fitoquelatinas de los cultivos con diferentes concentraciones de plomo presentadas y entre el control en el cual la producción de fitoquelatinas está ausente. (Fig. 6).

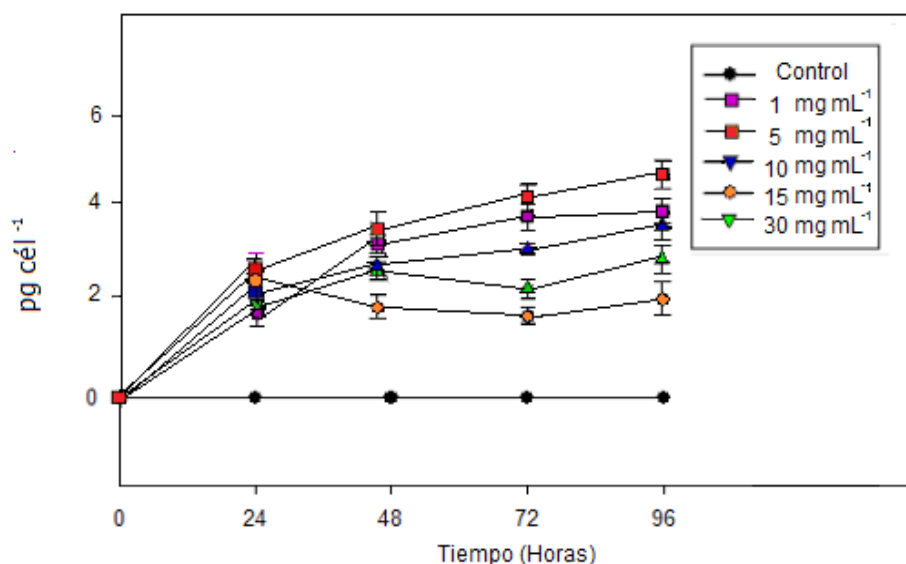


Figura 6. Contenido celular de fitoquelatinas en el cultivo control y en los distintos tratamientos con diferentes concentraciones de plomo. Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar.

La producción total de fitoquelatinas por volumen de cultivo es mayor en los cultivos de con concentraciones de plomo más bajas (1 y 5 mg L⁻¹), debido a la presencia del contaminante, en contraposición con el control en el cual el contaminante está ausente. Las concentraciones que se encuentran por debajo de un determinado umbral (menor a 10 mg L⁻¹), presentan una producción más elevada de fitoquelatinas. Esto es debido a que las microalgas presentan diversos mecanismos de defensa celular mientras que en concentraciones por encima de ese umbral (15 y 30 mg L⁻¹), estos mecanismos dejan de ser efectivos aunque están presentes, provocando así importantes descensos en la tasa de crecimiento de la microalga.

5. Conclusiones.

La exposición de los cultivos de *Tetraselmis suecica* a concentraciones superiores a 10 mg L⁻¹ de plomo, provoca diferencias significativas en los parámetros analizados como en el crecimiento, y el contenido en pigmentos donde se observa un descenso en la concentración celular de las clorofilas *a* y *b* y de los carotenoides, por lo que el plomo es un metal tóxico para esta especie de microalga. Como mecanismo de defensa, ante la presencia de este contaminante, *Tetraselmis suecica* induce la producción de fitoquelatinas.

5. Conclusión.

A exposición dos cultivos de *Tetraselmis suecica* a concentración superior a 10 mg L⁻¹ de chumbo, provoca diferenzas significativas nos parámetros analizados como o crecemento, e o contido en pigmentos, onde observase un descenso na concentración celular das clorofilas *a* e *b* e dos carotenoides. O que podería repercutir de forma negativa na súa taxa fotosintética, polo que indican que o chumbo é un metal tóxico para esta especie de microalga. Como mecanismo de defensa, ante a presenza deste contaminante, *Tetraselmis suecica* induce a produción de fitoquelatinas.

5. Conclusions.

Exposure of *Tetraselmis suecica* cultures at concentrations above 10 mg L⁻¹ of lead, causes significant differences in the parameters analyzed as growth, and a content of cellular pigment, where a decrease is observed in the cellular concentration of chlorophylls *a* and *b* carotenoids, so that lead is a toxic metal species of microalgae. As a defense mechanism, in the presence of this contaminant, *suecica* *Tetraselmis* induces the production of phytochelatin. Which indicate that lead is a toxic metal for this species of microalgae. *Tetraselmis suecica* induces phytochelatin's production, as a defense mechanism in the face of this pollutant.

6.

Bibliografía.

- Banni, M., Jebali, J., Daubeze, M., Clerandau, C., Guerbej, H., Narbonne, J. F. & Boussetta, H. (2005). Monitoring pollution in Tunisian coasts: application of a classification scale based on biochemical markers. *Biomarkers*. 10: 105-116.
- Blaise, C. R. (1993). Practical laboratory applications with micro-algae for hazard assessment of aquatic contaminants. *Ecotoxicology Monitoring*. 83–108.
- Borowitzka M. A. (1988). Algal growth media and sources of cultures. Micro-algal Biotechnology. *Cambridge University Press, Cambridge, UK*. 456–465.
- Bryan, G.W. (1971). Effects of heavy metals (other than mercury) on marine and estuarine organisms . *Proceedings of the royal society series B – Biological sciences*. 177 (1048): 389-408.
- Bryan, G.W. & Langston, W.J. (1992). Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: A review. *Environ Pollut*. 76: 89–131.
- Budd, P.; Montgomery, J.; Cox, A.; Krause, P.; Barreiro, B. & Thomas, R.G. (1998) The distribution of lead within ancient and modern human teeth: Implications for long-term and historical exposure monitoring. *Science of the total environment*. 220 (2-3): 121-136.
- Butcher, R. W. (1959). An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. Part I. Introduction and *Chlorophyceae*. *Fish In Min Fish Food*. 4: 71-74.
- Capo, M. (2002). Principios de ecotoxilacología: Diagnóstico, tratamiento y gestion del medioambiente. McGraw-Hill. p.66.
- Caprio, R.J, Margulis H.L & Joselow, M.M. (1974). Lead absorption in children and Its relationship to urban traffic densities. *Archives of environmental health*. April. 195-197.
- Chen, J.M., Tan, M.G., Li, Y.L., Zhang, Y.M., Lu, W.W. Tong, Y.P., Zhang, G.L. & Li, Y.A. (2005). Lead isotope record of shanghai atmospheric lead emissions in total suspended particles during the period of phasing out of leaded gasoline. *Atmospheric environment*. 39 (7): 1245-1253.
- Cordero, J., Guevara, M., Morales, E. & Lodeiros, C. (2005). Effect of heavy metals on the growth of the tropical microalga *Tetraseremis chuii* (*Prasinophyceae*). *Rev Bio Trop*. 53 (3-4): 325-330.

- Couderchet M. & Vernet G. (2003). Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 55: 271-277.
- Debeliusa, B., Forjaa, J.M., Del Vallsa, A. & Lubián, L. (2009) Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72 (5): 1503- 1513.
- Fábregas, J. (1984). Las microalgas como eslabón de infraestructura en la Microbiología Marina: aislamiento, caracterización, ciclo celular y aprovechamiento tecnológico. *Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela*.
- Fábregas, J., Otero, A., Domínguez, A. & Patiño, M. (2001) Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. *Journal of Marine Biotechnology*. 3: 256–263.
- Franklin, N. M., Adams, M. S., Stauber, J. L., Lim, R. P. (2001 a). Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 40: 469-480.
- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.L. & Zenk MH. (1988). Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch Microbiol*. 150: 197–202.
- Geoffroy, L., Gilbin, R., Simon, O., Floriani, M., Adam, C., Pradines, C., Cournac, L. & Garnier-Laplace, J. (2007). Effect of selenate on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*. 83: 149-158.
- Gomez-Alvarez, A., Meza-Figueroa, D., Villalba-Atondo, A., Valenzuela-Garcia, J., Ramirez-Hernandez, J. & Almendariz-Tapia, J. (2009) Estimation of potential pollution from mine tailings in the San Pedro River (1993-2005). *Mexico-US border*. 57 (7): 1469-1479.
- Goretti, E., Pallottini, M., Ricciarini, M.I., Selvaggi, R. & Cappelletti, D. (2016) Heavy metals bioaccumulation in selected tissues of red swamp crayfish: An easy tool for monitoring environmental contamination levels. *Science of the total environment*. 559: 339-34.
- Hendry G. A. F. & Price A. H. (1993). Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. *In: Hendry GAF, Grime JP (eds), Methods in comparative plant ecology. Chapman & Hall, London, UK.* 148-152 pp.

- Jamers, A., Blust, R. & De Coen, W. (2009). Omics in algae: Paving the way for systems biological understanding of algal stress phenomena?. *Aquat. Toxicol.* 92: 114-121.
- Jarup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin* . 68: 167-182.
- Jeffrey S. W. & Humphrey G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanzen.* 167: 191-194.
- Kampa, M. & Castanas, E. (2008) Human health effects of air pollution. *Environmental pollution.* 151 (2): 362-367.
- Liua, G., Chaib, X., Shaob, Y., Hub, L., Xieb, Q. & Wub, H. (2011) Toxicity of copper, lead, and cadmium on the motility of two marine microalgae *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis chui*. *Journal of Environmental Sciences.* 23 (2): 330-335.
- Magaril, E. (2016) *Improvement of the environmental and operational characteristics of vehicles through decreasing the motor fuel density.* *Environmental science and pollution research.* 23 (7): 6793-6802.
- Magee, E., Hall, H. & Varga G. (1973) "Potencial pollutants in fossil fuels" *U.S. Environmental protection agency.*
- Monteiro, C. M. Castro, P. & Malcata, F.X. Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology progress.* 28(2): 299-311.
- Morineau, T. O., Legentilhomme, P., Jaouen, P., Lepine, B. & Rince, Y. (2001) Influence a swirl motion on the interaction between microalgal cells and environmental medium during ultrafiltration of a culture of *Tetraselmis suecica*. *Biotechnology Letters.* 23: 1539-1545.
- Needleman, H. (2004) Lead poisoning. *Annual review of medicine.* 55: 209-222.
- Perales-Vela, H.V., Pena-Castro, J.M. & Canizares-Villanueva, R.O. (2006) Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere.* 64 (1): 1-10.
- Robinson, N.J. (1989) Algal metallothioneins: Secondary metabolites and proteins. *J Phycol.* 1: 5-18.

- Rodolfi, L., Chini, Z. G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. & Tredici, M. (2009) Microalgae for oil: *Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor. Biotechnology and Bioengineering.* 102(1): 100-112.
- Smith, D.R.; Osterloh, J.D. & Flegal, A.R. (1996) Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from the skeleton Environmental health perspectives. 104 (1): 60-66.
- Soto-Jimenez, M.F., Arellano-Fiore, C., Rocha-Velarde, R., Jara-Marini, M.E., Ruelas-Inzunza, J., Voltolina, D., Frias-Espericueta, M.G., Quintero-Alvarez, J.M. & Paez-Osuna, F. (2011) *Biological responses of simulated marine food chain to lead addition. Environmental Toxicology and Chemistry.* 30 (7): 1611-1617.
- Stauber, J. L. & Davies, C. M. (2000). Use and limitations of microbial bioassays for assessing copper bioavailability in the aquatic environment. *Environmental Reviews.* 8: 255-301.
- Strom, D., Ralph, P. J. & Strauber, J. L. (2009). Development of a toxicity identification evaluation protocol using chlorophyll-a fluorescence in a marine microalga. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 56: 30-38.
- Van Wezel, A.P. & van Vlaardingen, P. (2004). Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquatic Toxicology.* 66: 427-444.
- Wood, J.M. (1976) "The biochemistry of toxic elements in aqueous systems. In: Biochemical and biophysical perspectives in Marine biology" Ed. D. C. Malins and J.R. Sargent. Vol 3. Academic Press, London 407-431.
- Xu, D., Li, C., Chen, H. & Shao, B. (2013). Cellular response of freshwater green algae to perfluorooctanoic acid toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 88: 103-107.
- Yap, C.K., Ismail, A., Omar, H. & Tan, S.G. (2004) Toxicities and tolerances of Cd, Cu, Pb and Zn in a primary producer (*Isochrysis galbana*) and in a primary consumer (*Perna viridis*). *Environment International.* 29: 1097– 1104.

