

## Evaluación de la toxicidad de cianofitas sobre el microcrustáceo *Artemia*

### Cyanophytes toxicity evaluation on *Artemia* micro crustacean

J. Ortega, R. Rivas, L. Jonte, R. Mora y E. Morales

Laboratorio Microorganismos Fotosintéticos, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.

### Resumen

Se evaluó la toxicidad de tres cepas de cianofitas autóctonas, *Microcystis*, *Limnothrix* y *Oscillatoria* mediante bioensayos por triplicado hasta 48 horas de exposición sobre el microcrustáceo *Artemia*, utilizando diferentes concentraciones de fracciones hidrosolubles, con tratamiento térmico y liposolubles extraídas de la biomasa cosechada de cada cultivo de alga en agua de mar a proporciones de 1:2, 1:5, 1:10 y 1:25 (fracción:agua de mar). Se detectó una alta toxicidad en la fracción hidrosoluble en función de la concentración y además demostró ser termoestable en *Oscillatoria* y *Microcystis*. En cambio, la fracción liposoluble resultó inocua para *Microcystis* y *Oscillatoria* y tóxico en *Limnothrix*. El crecimiento masivo de estas algas en cuerpos de agua puede implicar un posible efecto nocivo sobre la fauna.

**Palabras clave:** Alga, cianofita, toxicidad, fracción hidrosoluble, liposoluble, *Artemia*.

### Abstract

Toxicity of three strains of autochthonous cyanophytes: *Microcystis*, *Limnothrix* and *Oscillatoria* was evaluated in bioassays by triplicate until 48 hours of exposition on *Artemia*, by using different concentrations of hydrosoluble fractions and with a thermic treatment; and liposoluble fractions extracted from harvested biomass of each cyanophyte culture in seawater to proportions of 1:2, 1:5, 1:10 and 1:25 (fraction : seawater). A high toxicity was detected in the hydrosoluble fraction in function of the concentration; also, it was demonstrated

its thermo stability in *Oscillatoria* and *Microcystis*. On the contrary, liposoluble fraction was innocuous for *Microcystis* and *Oscillatoria* and toxic in *Limnothrix*. The massive growth of these algae in water bodies implies a possible noxious effect on the wildlife.

**Key words:** Algae, cyanophyte, toxicity, hydrosoluble and liposoluble fractions, *Artemia*.

## Introducción

Las cianofitas marinas y de agua dulce son consideradas una fuente de metabolitos de importancia industrial, biotecnológica o medicinal (1). Sin embargo, algunas algas pueden presentar toxicidad por efecto de competencia en su medio natural. Una de las pruebas fundamentales consiste en analizar extractos de biomasa de

algas cultivadas o cosechada de ambientes acuáticos sobre el microcrustáceo *Artemia* (3). En este estudio se evaluó el potencial tóxico que pueden presentar tres cepas de cianofitas, *Oscillatoria*, *Limnothrix* y *Microcystis* aisladas de aguas marinas y continentales de Venezuela.

## Materiales y métodos

Las cianofitas *Oscillatoria* y *Limnothrix* fueron aisladas de cuerpos de aguas marinos; de lagunas para el cultivo de camarón en Ricoa, edo. Falcón y de la laguna de Gato Negro en el sistema Lagunar de Las Peonías, estado Zulia, respectivamente. Por otro lado, *Microcystis* fue colectada de una laguna de estabilización de aguas residuales perteneciente al Centro de Investigación del Agua (CIA-LUZ). La identificación de las cepas se realizó según claves taxonómicas especializadas (5). Las cianofitas marinas se cultivaron en condiciones de laboratorio con medio inorgánico Algal a 8 mM NaNO<sub>3</sub>, y su crecimiento se evaluó mediante peso seco y contenido de pigmentos medidos por espectrofotometría. La biomasa de *Microcystis* fue colectada, concentrada y congelada a -20°C.

Se realizaron análisis de toxicidad sobre el microcrustáceo *Artemia* en fase adulta (2) con la fracción hidrosoluble con o sin tratamiento térmico y fracciones liposolubles extraídos de biomasa fresca de las microalgas en estudio (4, 6). Los ensayos de toxicidad sobre *Artemia* se realizaron en agua de mar en una relación 1:1 (*Artemia*: mL solución). Se estudiaron todas las fracciones extraídas de las cianofitas en proporciones: 1:2, 1:5, 1:10 y 1:25. Las artemias adultas fueron alimentadas diariamente con la microalga marina *Chroomonas*. Los controles y tratamientos por triplicado se mantuvieron hasta las 48 h. Se determinó la LC<sub>50</sub> con la finalidad de corroborar el efecto tóxico de las fracciones a la cual muere el 50% de los organismos expuestos (2).

## Resultados y discusión

Los valores de peso seco y la cuantificación de metabolitos sirvieron como referencia para comparar la productividad de las cianobacterias. Los máximos valores de peso seco ( $18,58 \pm 2,51$  mg.mL<sup>-1</sup>), clorofila *a* ( $18,98 \pm 3,37$  µg.mL<sup>-1</sup>) y de ficobiliproteínas ( $100,48 \pm 10,01$  µg.mL<sup>-1</sup>) correspondieron a *Microcystis* con respecto a las otras dos cianofitas (cuadro 1).

A partir de fracciones hidrosolubles y liposolubles extraídas de la biomasa de las cianofitas *Microcystis*, *Limnothrix* y *Oscillatoria* se evaluó la actividad biológica de estas fracciones a las 48 horas de exposición sobre individuos del microcrustáceo *Artemia* a diferentes concentraciones de las fracciones, en función del tiempo.

El pigmento hidrosoluble (PHS) de *Microcystis* alcanza su máximo efecto tóxico a las proporciones 1:10 y 1:5 con concentraciones equivalentes de 10,05 y 20,10 µg mL<sup>-1</sup> respectivamente, en las primeras 48 horas de exposición, con un 100% de mortalidad de los crustáceos (cuadro 2). Dicho efecto disminuye a un 16% de mortalidad en la menor proporción 1:25 con una concentración equivalente de 4,02 µg.mL<sup>-1</sup>. El análisis de la LC<sub>50</sub> señala una concentración de 5,91 µg.mL<sup>-1</sup> en la cual se estima mueren el 50% de los individuos. Sin embargo, la toxicidad de los pigmentos hidrosolubles (PHS) extraídos de las microalgas *Limnothrix* y *Oscillatoria* parece ser más eficaz a la exhibida por la microalga *Microcystis*.

Los resultados demostraron una

mortalidad en *Artemia* del 100% a todas las concentraciones durante las primeras 48 horas de exposición, resaltando la fracción hidrosoluble extraída de la cianofita *Limnothrix* donde se alcanzó un 100% de mortalidad sobre *Artemia* a la menor proporción usada; es decir, 1:25, con una concentración equivalente de 1,61 µg mL<sup>-1</sup> (cuadro 2). Estos resultados fueron corroborados al realizar el análisis de LC<sub>50</sub> para cada una de las fracciones estudiadas evidenciando en *Limnothrix* un LC<sub>50</sub> < 1,61 µg.mL<sup>-1</sup> y para *Oscillatoria* un LC<sub>50</sub> < 3,364 µg.mL<sup>-1</sup>.

La actividad biológica de los pigmentos hidrosolubles de las cianofitas *Oscillatoria* y *Microcystis* sometidos a tratamiento térmico (PHS-CTT) no sólo se mantuvo, sino que además se incrementó (cuadro 2). La toxicidad de la fracción fue directamente proporcional a la concentración en las primeras 48 horas de exposición sobre *Artemia* con un porcentaje de mortalidad del 100% para las proporciones de 1:10 y 1:5 de *Microcystis*, y 1:5 y 1:2 en *Oscillatoria*, disminuyendo estas en las menores proporciones (cuadro 2). Aún cuando se mantuvo la misma tendencia de toxicidad con los pigmentos hidrosolubles (sin tratamiento térmico), la relación porcentual de la mortalidad fue mayor en los pigmentos hidrosolubles sometidos a tratamiento térmico (autoclavado a 121°C con 15 PSI por un tiempo de 15 minutos), aún a las menores proporciones probadas. Estos resultados fueron corro-

**Cuadro 1. Peso seco, contenido de pigmentos liposolubles y contenido de pigmentos hidrosolubles para las cianobacterias estudiadas.**

	Peso seco mg mL <sup>-1</sup>	Clo. <i>a</i> µg mL <sup>-1</sup>	Carot. µg mL <sup>-1</sup>	PLS µg mL <sup>-1</sup>	Ficoc. µg mL <sup>-1</sup>	Alofic µg mL <sup>-1</sup>	PHS µg.mL <sup>-1</sup>
<i>Microcystis</i>	18,58±2,51	18,98±3,37	2,09±0,37	21,07±3,74	65,82±6,74	34,67±3,27	100,48±10,01
<i>Limnothrix</i>	5,96±0,37	12,28±1,52	3,42±0,33	15,70±1,85	32,84±1,66	7,40±0,75	40,24±2,40
<i>Oscillatoria</i>	6,14±0,57	11,13±0,30	2,76±0,31	13,89±0,61	25,76±4,04	7,88±1,76	33,64±5,80

Clo. *a*: clorofila *a*. Carot: carotenoides, PLS: Pigmentos liposolubles, Ficoc: Ficocianina, Alofic: Aloficocianina, PHS: Pigmentos hidrosolubles.

**Cuadro 2. Porcentaje (%) de mortalidad sobre *Artemia* en función a las concentraciones de las diferentes fracciones extraídas de las microalgas *Microcystis*, *Limnothrix* y *Oscillatoria*.**

	<i>Microcystis</i>			<i>Limnothrix</i>			<i>Oscillatoria</i>		
Tratamiento	C	1:25	1:10	1:5	C	1:25	1:10	1:5	1:2
PHS	0	16	100	100	0	100	100	100	100
PHS-autoC	0	36	100	100	0	4	6	7	13,3
PLS	0	4	15	12	0	0	5	23	0

PHS: Pigmento hidrosoluble; PHS-autoC: Pigmentos hidrosolubles autoclavada; PLS: Pigmentos liposolubles. *Microcystis*: PHS 1:25 = 4,02 µg.mL<sup>-1</sup>, 1:10=10,05 µg.mL<sup>-1</sup>, 1:5 = 20,10 µg.mL<sup>-1</sup>, PLS 1:25 = 0,84 µg.mL<sup>-1</sup>, 1:10 = 2,11 µg.mL<sup>-1</sup>, 1:5 = 4,21 µg.mL<sup>-1</sup>, *Limnothrix*: PHS 1:25 = 1,61 µg.mL<sup>-1</sup> 1:10 = 4,02 µg.mL<sup>-1</sup>, 1:5 = 8,05 µg.mL<sup>-1</sup>, PLS 1:25 = 0,63 µg.mL<sup>-1</sup>, 1:10 = 1,57 µg.mL<sup>-1</sup>, 1:5 = 3,14 µg.mL<sup>-1</sup>, *Oscillatoria*: PHS 1:10 = 3,36 µg.mL<sup>-1</sup>, 1:5 = 6,73 µg.mL<sup>-1</sup>, 1:2 = 16,82 µg.mL<sup>-1</sup>, PLS 1:25 = 0,56 µg.mL<sup>-1</sup>, 1:10 = 1,39 µg.mL<sup>-1</sup>, 1:5 = 13,89 µg.mL<sup>-1</sup>.

borados con el análisis de la  $LC_{50}$  el cual evidencia para la microalga *Microcystis* una  $LC_{50}$  de  $4,72 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  es decir un aumento en la efectividad del poder tóxico de hasta 1,25 veces mayor al reportado para el extracto sin tratamiento térmico. Estos resultados señalan termoestabilidad del factor tóxico en las fracciones extraídas a partir de las microalgas *Microcystis* y *Oscillatoria*, y termosensibilidad en la fracción hidrosoluble extraída a partir de la microalga *Limnithrix*, lo cual sugiere que el factor tóxico de la cianofita *Limnithrix* pudiera ser de naturaleza peptídica.

Otra de las fracciones probada sobre *Artemia* fueron los pigmentos liposolubles (PLS) extraídos a partir de las microalgas *Microcystis* y *Oscillatoria* los cuales exhibieron

inocuidad sobre *Artemia* a las 48 horas de exposición (cuadro 2). El mayor porcentaje de mortalidad reportado para la microalga *Microcystis* fue de 15% y se registró a la proporción 1:10 con una concentración equivalente de  $2,11 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , mientras que el mayor porcentaje de mortalidad para *Oscillatoria* fue de 7% y se registró a la proporción 1:5 con una concentración equivalente de  $6,73 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Estos resultados indican que el factor tóxico de ambas cianofitas fue de naturaleza hidrofílica, lo cual explica que las técnicas de extracción con solventes orgánicos como el metanol no es efectiva en la remoción o extracción del factor tóxico. Las  $LC_{50}$  reportadas para las microalgas *Microcystis* y *Oscillatoria* fueron de 98, 85 y  $2232,94 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente.

## Conclusiones

La fracción hidrosoluble contiene la mayor actividad tóxica en las algas evaluadas. Considerando los valores de  $LC_{50}$  se puede atribuir una fuerte actividad tóxica de los pigmentos solubles en agua lo que re-

presenta un peligro potencial para los seres vivos en ambientes acuáticos donde crecen estas cianofitas. Las fracciones extraídas a partir de las microalgas *Microcystis* y sugiere que pudiera ser de naturaleza peptídica.

## Literatura citada

1. Burja, A., B. Banaigs, E. Abou-Mansour, J. Grant y P. Wright. 2001. Marine cyanobacteria - a prolific source of natural products. *Tetrahedron*. 57: 9347-9377.
2. Caldwell, G., M. Bentley, y P. Olive. 2003. The use of brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. *Toxicon*. 42: 301-306.
3. Carmichael, W. 1994. Toxinas de cianobacterias. *Investigación y Ciencia*. 22-29.
4. Marker, A., E. Nusch, H. Rai y B. Riemann. 1980. The measurement of photosynthetic pigments in freshwater and standardization of methods: Conclusions and recommendations. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol* 14: 91-106.

5. Rippka, R., J. Deruelles, J. Waterbury, M. Herdman y R. Stanier. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61.
6. Wyman, M. y P. Fay. 1986. Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic blue-green algae (cyanobacteria). I. Influence of light quantity. *Proceedings of the Royal Society, B.* 227: 367-380.