

**INFLUENCIA DEL PETRÓLEO CRUDO
EN EL CRECIMIENTO DE MICROALGAS DEL
NORORIENTE DE VENEZUELA**

RORAYSI CORTEZ-MAGO, MIGUEL GUEVARA, ALEIKAR VÁSQUEZ
Y CÉSAR LODEIROS-SEIJO

*Lab. Acuicultura, Extensión Plancton, Departamento de Biología Pesquera,
Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente,
Cumaná 6101, Venezuela
roraysi@yahoo.com*

Resumen. Se evaluó el efecto del petróleo crudo sobre el crecimiento y la concentración de clorofila *a* en las microalgas del nororiente de Venezuela *Tetraselmis* sp. (G1), *Chaetoceros* sp. (A1) y *Dunaliella salina* (C1), cultivadas en sistemas discontinuos bajo condiciones controladas de temperatura (25 ± 1 °C), iluminación ($39,0625 \mu\text{Em}^2/\text{s}$, fotoperíodo 12:12) y salinidad (37 UPS). Los cultivos fueron expuestos por 96 h a diferentes concentraciones (0, 10, 25 y 50 %) de una fracción acuosa de petróleo durante las diferentes fases de crecimiento microalgal. El crecimiento fue evaluado a las 6, 12, 24, 48 y 96 h mediante el recuento celular y contenido de clorofila *a* al inicio, 48 y 96 h. La fracción acuosa del petróleo influyó sobre el crecimiento y la concentración de clorofila *a*, produciéndose una disminución significativa y proporcional al incremento de la concentración del contaminante. Los mayores efectos se evidenciaron a partir de la concentración de 25%, generalmente a las 6 h, mostrando que *Chaetoceros* sp. (A1) posee mayor sensibilidad en la fase logarítmica inicial y *Dunaliella salina* (C1) en la fase estacionaria. *Chaetoceros* sp. (A1) fue la microalga que presentó los valores mayores de clorofila *a*, a las 96 h, en las tres fases de crecimiento, estableciéndose su máximo en la fase estacionaria ($3,4 \pm 0,31$ pg/cel al 10%), mientras que *Dunaliella salina* (C1) mostró los valores menores de $0,30 \pm 0,13$ pg/cel al 50 % del contaminante a las 96 h en fase estacionaria. El crecimiento y el contenido de clorofila *a* de las microalgas evidencian la sensibilidad al petróleo, lo cual sugiere recomendarlas para análisis ecotoxicológicos de corta duración. *Recibido: 03 agosto 2007, aceptado: 26 octubre 2007.*

Palabras clave. Microalgas, crecimiento, petróleo, Venezuela, prueba ecotoxicológica, *Chaetoceros* sp., *Dunaliella salina*.

INFLUENCE OF CRUDE PETROLEUM ON
GROWTH OF MICROALGAE FROM NORTHEAST VENEZUELA

Abstract. The effect of crude petroleum on growth and chlorophyll *a* concentration were evaluated in the microalgae *Tetraselmis* sp. (G1), *Chaetoceros* sp. (A1) and *Dunaliella salina* (C1) from Northeastern Venezuela. The microalgae were cultivated in discontinuous systems, under controlled conditions of temperature (25 ± 1 °C), illumination ($39.0625 \mu\text{Em}^2/\text{s}$, photoperiod 12:12), and salinity (37 PSU). The microalgae cultures were exposed to different concentrations (0, 10, 25 and 50%) of a water-soluble fraction of petroleum for 96 h, during different growth phases. Microalgae growth was evaluated at 6, 12, 24, 48 and 96 h by cellular count; chlorophyll *a* concentration was evaluated at the start of the growth phases, at 48 h, and at 96 h. The water-soluble fraction induced a significant decrease in growth and chlorophyll *a* concentration, and the decrease was directly proportional to the concentration of the contaminant. Greatest effects were observed starting at a 25% concentration (generally at 6 h), showing that *Chaetoceros* sp. (A1) was most sensitive during the initial logarithmic phase and *Dunaliella salina* (C1) during the stationary phase. *Chaetoceros* sp. (A1) showed the highest chlorophyll *a* values at 96 h, in all three phases of growth, with the maximum at the stationary phase (3.4 ± 0.31 pg/cell at 10%), whereas *Dunaliella salina* (C1) showed the lowest values (0.30 ± 0.13 pg/cell, at 50% contaminant) after 96 h, in the stationary phase. Because the microalgae showed evident sensitivity to petroleum, we recommend short term ecotoxicological analyses, using growth and chlorophyll *a* content. *Received: 03 August 2007, accepted: 26 October 2007.*

Key words. Microalgae, growth, petroleum, Venezuela, ecotoxicological test, *Chaetoceros* sp., *Dunaliella salina*.

INTRODUCCIÓN

El medio acuático, y en especial el marino, es uno de los ambientes más expuestos a los contaminantes, debido a que las descargas terrestres, acuático-terrestres o atmosféricas, tienen como receptáculo final el mar. En estos sistemas el principal componente es el fitoplancton, por lo que un cambio, cualitativo o cuantitativo podría repercutir drásticamente en el medio (Walsh *et al.* 1987).

La realización de bioensayos o pruebas de toxicidad para determinar el efecto de compuestos antropogénicos, son actividades importantes en el proceso de evaluación de los riesgos ambientales, debido a la acción de

sustancias químicas, efluentes y desechos de la actividad del hombre (Warren 1971, Sánchez y Vera 2001). Durante un derrame de petróleo, algunos de sus componentes permanecen inalterados en el medio marino, siendo dispersados y a la vez consumidos y bioacumulados por el plancton, pasando de esta manera a otros niveles tróficos hasta llegar a los organismos bentónicos que también los pueden bioacumular, o bien van a los sedimentos, permaneciendo allí por largos períodos, ya que la transformación y degradación del petróleo es lenta. En este contexto algunos de sus componentes, por ejemplo metales pesados, cuando son expuestos al fitoplancton a concentraciones elevadas, pueden inhibir el crecimiento y producir cambios morfológicos y fisiológicos que tienen como consecuencia una menor capacidad de respuesta de las poblaciones al ambiente, afectando a la cadena trófica (Walsh *et al.* 1987; Visviki y Rachlin 1994).

Los efectos tóxicos de los hidrocarburos del petróleo al fitoplancton marino son determinados generalmente comparando tasas de crecimiento y actividades fotosintéticas en cultivos del fitoplancton expuestos a dicho hidrocarburo con un control no contaminado. De esta manera, las pruebas de toxicidad con especies fitoplanctónicas representan una herramienta esencial para la validación del potencial tóxico de compuestos. En este sentido, estudios relacionados con el efecto del petróleo sobre las microalgas pueden aportar, además de conocimiento, información de mucha importancia en el área de ecotoxicología, la cual permitiría evaluar y predecir posibles daños causados por eventualidades asociadas a las actividades petroleras. Debido a las crecientes actividades antropogénicas en la zona nororiental de Venezuela, relativa a hidrocarburos, se planteó evaluar el efecto del petróleo en microalgas autóctonas del nororiente de Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las microalgas utilizadas: *Tetraselmis* sp. (G1) obtenida del Golfo de Cariaco (10°26'N y 63°38'O) y *Chaetoceros* sp. (A1) aislada de la Península de Araya (10°37'N y 64°17'O), ambas localidades del estado Sucre, y *Dunaliella salina* (C1) aislada de las salinas de Coche, estado Nueva Esparta; corresponden a cepas autóctonas del nororiente de Venezuela, pertenecientes al cepario de microalgas del Laboratorio de Acuicultura del Instituto Oceanográfico de Venezuela de la Universidad de Oriente (IOV-UDO).

Para la realización de los experimentos, las microalgas se aclimataron y cultivaron en el medio Algal con concentración de 8 mmol/L de nitrato (Fábregas *et al.*, 1984) bajo condiciones controladas de temperatura (25 ± 1 °C), iluminación ($39,0625 \mu\text{Em}^2/\text{s}$, fotoperíodo 12:12) y salinidad (37 UPS).

Los cultivos se realizaron por triplicado, de forma discontinua, utilizando envases de vidrio de 2 L de capacidad con 1,5 L de agua de mar filtrada (papel Whatman GF/C 0,45 μm), esterilizada en autoclave y fertilizada con el medio Algal con 8 mmol/L de nitrato. Los cultivos se agitaron manualmente dos veces al día. Cuando los cultivos alcanzaron las diferentes fases de crecimiento (logarítmica inicial, logarítmica final y estacionaria) se procedió a extraer muestras para ser sometidas a diferentes concentraciones (0, 10, 25 y 50 %) de la fracción acuosa del hidrocarburo Mesa (PDVSA, Línea 26, Troncal 54: petróleo mediano con grado API 30,5).

La fracción acuosa del petróleo se obtuvo mediante la combinación de 100 mL del hidrocarburo con 900 mL de agua de mar filtrada y esterilizada con el mismo tratamiento para los cultivos, manteniéndola en agitación constante durante 24 h a 25 °C; posteriormente, la mezcla se colocó en un embudo de separación para obtener así la fracción hidrosoluble siguiendo las recomendaciones en Nascimento *et al.* (2002).

La obtención de las células microalgales se logró a través de la centrifugación de 100 mL de muestra de los cultivos (3000 rpm/10 min), a los cuales se les añadió 200 mL de agua de mar filtrada y esterilizada para el tratamiento control (0 % de contaminante), 180 mL de agua de mar y 20 mL de la fracción acuosa para obtener el tratamiento de 10 % de fracción acuosa, y de igual manera 150 mL y 100 mL de agua de mar con 50 y 100 mL de la fracción acuosa del petróleo, respectivamente, para obtener la concentración de 25 y 50 % del contaminante. A todos estos tratamientos se les suministró los nutrientes del medio algal equivalentes a 200 mL.

Para la evaluación del efecto de las diferentes concentraciones del petróleo sobre los cultivos, se determinó la densidad celular, mediante el recuento de las microalgas utilizando un microscopio óptico y una cámara de Neubauer, a partir de muestras de 0,5 mL de cada réplica a las 6, 12, 24, 48 y 96 h del experimento. En función de minimizar el error generado por la variabilidad del número celular de las réplicas, la evaluación se estableció transformando los datos en porcentaje de incremento o decrecimiento celular con respecto a la densidad inicial de cada réplica. De igual manera, se tomaron muestras de 5 mL al inicio de la exposición al contaminante, a las 48 y 96 h de cada réplica para determinar la concentración de clorofila *a*, mediante el método de Jeffrey y Humphrey (1975).

Para evaluar la influencia de la fracción acuosa del petróleo sobre las microalgas, debido a las evidentes diferencias en el tiempo, se aplicó un análisis de ANOVA multifactorial para los resultados de crecimiento y

clorofila *a*, en cada uno de los tiempos de exposición, siendo los factores la especie, la fases de crecimiento y la concentración de la fracción acuosa del petróleo. En cada uno de los factores que resultaron con diferencias significativas ($P < 0,05$) se realizó un análisis a posterior de Scheffé para establecer diferencias entre los tratamientos. Previo a estos análisis, se evaluó la normalidad y homogeneidad de varianzas siguiendo las recomendaciones en Zar (1984).

RESULTADOS

La Figura 1 muestra los porcentajes de las densidades celulares de las microalgas analizadas durante los tiempos de exposición a diferentes concentraciones de la fracción acuosa de petróleo en tres fases de crecimiento (logarítmica inicial, logarítmica final y estacionaria). En casi todos los tiempos de exposición del contaminante, todos los factores mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$), con interacciones entre ellos, debido a las diferentes respuestas en las condiciones dadas, a excepción de las distintas especies a las 6 h en las que no se encontró interacción significativa de las fases de crecimiento y las concentraciones del contaminante.

Durante la exposición al 10 % del contaminante, *Dunaliella salina* (C1) y *Tetraselmis* sp. (G1) en la fase logarítmica inicial, *Tetraselmis* sp. (G1) en la logarítmica final y *Tetraselmis* sp. (G1) y *Chaetoceros* sp. (A1) en la estacionaria, mostraron incrementos con respecto a la densidad inicial, sugiriendo, efectos subletales a dicha concentración. *Dunaliella salina* muestra los más elevados incrementos en la fase logarítmica inicial; sin embargo, los mayores decrecimientos en la fase estacionaria. *Chaetoceros* sp. (A1) presenta un comportamiento contrario.

Los efectos letales de la fracción acuosa del petróleo se hicieron evidentes a partir de la concentración de 25 %, y generalmente a las 6 h. A pesar de las múltiples respuestas en las densidades celulares de las microalgas durante las fases de crecimiento en las distintas concentraciones del contaminante, se observó un patrón similar en todos los cultivos con 10 y 25 % de la fracción hidrosoluble. Caso contrario ocurrió a 50 % en donde se evidenció una notable disminución de la densidad inicial, que alcanza el 50 % en casi todos los tratamientos y la posterior estabilización de la densidad, particularmente en fase estacionaria. Las respuestas en cada uno de los tratamientos muestran una mayor sensibilidad al contaminante de *Tetraselmis* sp. (G1) y *Chaetoceros* sp. (A1) en la fase logarítmica inicial y de *Dunaliella salina* (C1) en la fase estacionaria.

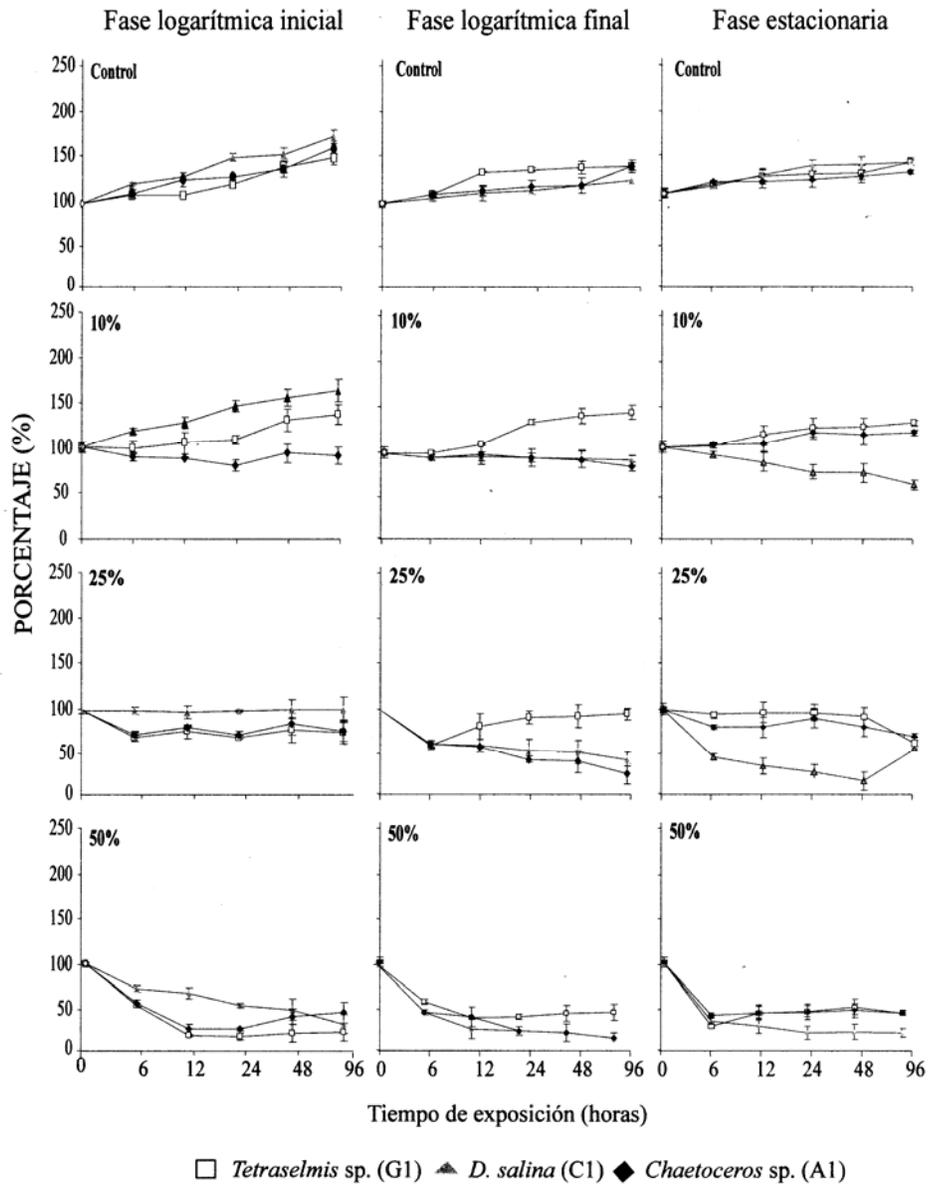


Figura 1. Efecto de la exposición de diferentes concentraciones de fracción acuosa de petróleo sobre el crecimiento en fase logarítmica inicial, fase logarítmica final y fase estacionaria de *Tetraselmis sp. (G1)*, *Dunaliella salina (C1)* y *Chaetoceros sp. (A1)*.

La Figura 2 muestra el contenido de clorofila *a* de las tres microalgas analizadas en las tres fases de crecimiento durante el tiempo de exposición a la fracción acuosa del petróleo. El análisis de varianza aplicado a las diferentes tiempos de exposición del contaminante (0, 48 y 96 h) para cada una de las fases mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) con interacciones entre las especies y concentración.

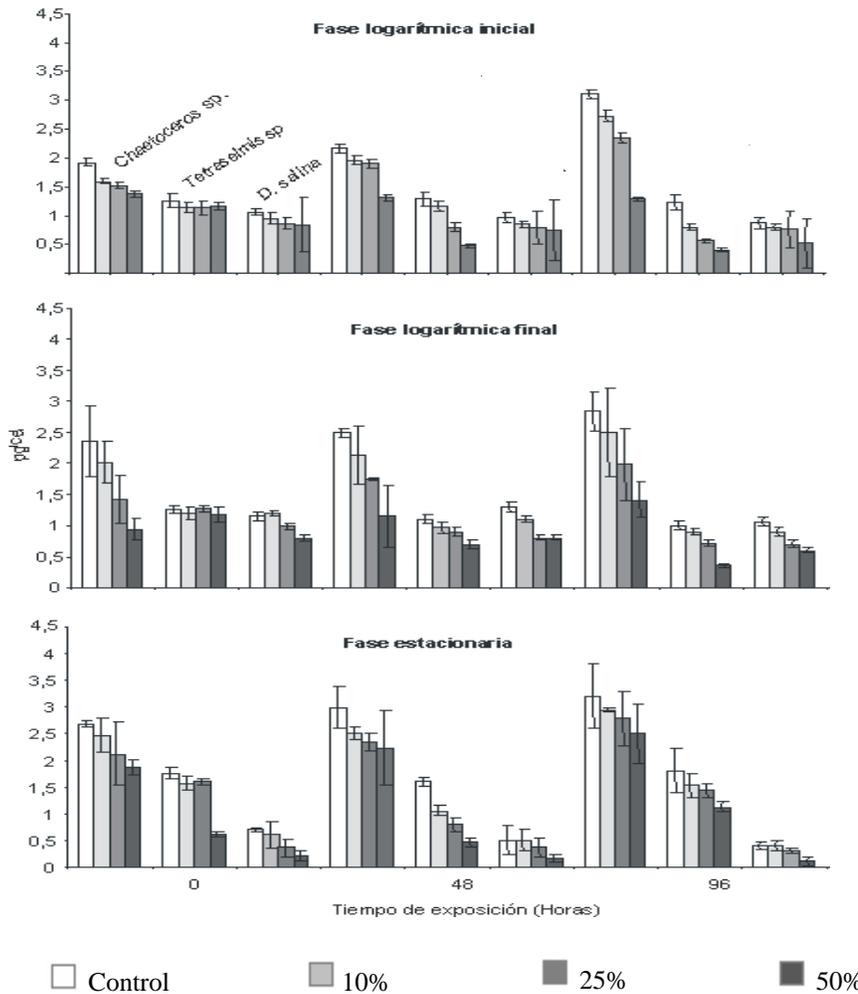


Figura 2. Efecto de la exposición de diferentes concentraciones de fracción acuosa de petróleo sobre el contenido de clorofila *a* en fase logarítmica inicial, fase logarítmica final y fase estacionaria (C) de *Tetraselmis sp.* (G 1), *Dunaliella salina* (C 1) y *Chaetoceros sp.* (A1).

Aunque existe variabilidad de respuestas en las microalgas expuestas a los distintos tratamientos, la tendencia fue a una disminución de la clorofila *a* con el aumento de la concentración del contaminante; incluyendo a las 0 h, lo que muestra un efecto instantáneo en las microalgas. Este efecto, se revela con mayor claridad en la fase estacionaria.

En todos los tratamientos la cepa *Chaetoceros* sp. (A1) presentó los valores mayores de clorofila *a*, particularmente a las 96 h, en las tres fases de crecimiento, por ejemplo la exposición al contaminante al 10 % mostró valores de $2,89 \pm 0,23$ pg/cel en la fase logarítmica inicial y de $3,42 \pm 0,31$ pg/cel en la fase estacionaria. *Tetraselmis* sp. (G1) y particularmente *Dunaliella salina* (C1) en la fase estacionaria, muestra los menores valores de $0,30 \pm 0,13$ pg/cel a la exposición del 50% del contaminante a las 96 h.

DISCUSIÓN

El crecimiento de las especies analizadas fue afectado negativamente por las distintas concentraciones de fracción acuosa de petróleo Mesa (PDVSA, Troncal 54, Línea 26) en comparación con el control, puesto que, al aumentar las concentraciones de la fracción acuosa, el número de células iniciales disminuyó con respecto al control en las tres fases de crecimiento.

De forma general, las respuestas de las algas al petróleo se hicieron evidentes a las 6h, en los tratamientos con concentraciones mayores al 10% de la fracción acuosa del petróleo; posterior a las 6 h los cambios no fueron notables.

En la exposición al 10 % del contaminante, *Dunaliella salina* (C1) y *Tetraselmis* sp. (G1) en la fase logarítmica inicial, *Tetraselmis* sp. (G1) en la logarítmica final y *Tetraselmis* sp. (G1) y *Chaetoceros* sp. (A1) en la estacionaria, mostraron incrementos de la densidad inicial, sugiriendo, poco efecto a dicha concentración. Fábregas *et al.* (1984) muestran poco efecto e inclusive una estimulación del crecimiento en *Tetraselmis suecica* con experimentos utilizando bajas concentraciones de hidrocarburos; de esta manera, la fracción soluble del petróleo, podría suplir elementos favorables al crecimiento, los cuales a elevadas concentraciones se vuelven tóxicos. Los resultados no evidencian esta hipótesis, ya que las tasas de crecimiento a la exposición de la fracción soluble fueron menores que las de sus respectivos controles (sin exposición al hidrocarburo). Estudios de la influencia de hidrocarburos a concentraciones subletales, con un análisis de la composición de los mismos y su efecto en el crecimiento y la fisiología de microalgas son

necesarios para dilucidar la hipótesis antes señalada. Por otra parte, *Chaetoceros* sp. (A1), muestra un leve incremento en la fase estacionaria y decrecimiento en la fase logarítmica inicial. Estos resultados indican variabilidad en la respuesta, al menos en concentraciones bajas o subletales del petróleo de las diferentes algas.

El efecto de mayor sensibilidad de *Dunaliella salina* (C1), probablemente se debe a que las especies del género *Dunaliella* no poseen pared celular como las otras microalgas, lo cual permitiría que la fracción acuosa del petróleo causara daños directos en las membranas celulares o bien una desorganización en el equilibrio osmótico celular, facilitando la entrada del tóxico a las células como lo indica Nechev *et al.* (2002) en experimentos con exposición de diesel en microalgas. Todo esto sugiere que la respuesta a los tóxicos asociados a hidrocarburos pueden ser específicos dependientes; en este sentido, estudios realizados con algunas especies de microalgas han demostrado que éstas presentan una respuesta diferente a hidrocarburos de petróleo (Semple *et al.* 1999, Al Hasan *et al.* 1994, 1998, 2001).

Las respuestas en cuanto a la disminución del crecimiento fue más evidente en la fase estacionaria, lo cual muestra menor condición de las microalgas en dicha fase. Evidentemente, en la fase estacionaria, los nutrientes son limitantes y las células como estrategia adaptativa entran en un estado de mantenimiento fisiológico, el cual condiciona mayor sensibilidad (Abalde *et al.* 1995). Si bien esta fase podría ser adecuada para realizar pruebas toxicológicas con mayor conservación en cuanto a la proyección de efectos ambientales, las variaciones por efecto del petróleo en este trabajo no fueron notablemente diferentes con respecto a las otras fases, además de ser un estado menos común al que podríamos encontrar en la naturaleza acuática, debido a la libre disponibilidad de nutrientes. Un factor adicional, para no considerar a microalgas en esta fase como adecuada para pruebas toxicológicas, lo representa el mayor tiempo en que tardan los cultivos en alcanzar a dicha fase, en este estudio 10–11 días, lo cual no mostraría una respuesta acorde a la celeridad en analizar cualquier evento de toxicidad. Tomando ello en cuenta y la similitud de respuestas, en la fase logarítmica inicial y final, entre 3 y 4 días para las diferentes microalgas utilizadas (obviando la fase de adaptación inicial), el uso de microalgas en la fase logarítmica es recomendable. Por otra parte, durante esta fase las células deben encontrarse en óptimas condiciones fisiológicas, relativas a su reproducción, por lo que se puede asegurar que el efecto del tóxico es extrapolable a la naturaleza.

Los resultados de disminución del crecimiento por efectos del petróleo, son similares a la inhibición o disminución del crecimiento en microalgas (*Isochrysis* sp., *Scenedesmus quadricauda*, *Anacystis nidulans*, *Selenastrum capricornutum*, *Chlorella vulgaris*, *Oocystis* sp., *Chlamydomonas reinhardtii*) ante fracciones acuosas de petróleo y otros derivados (Gaur y Kumar 1981, Tukaj 1987, Liebe y Fock 1992, Ansari *et al.* 1997). De igual manera se encontró poco efecto del contaminante a concentraciones bajas (10 %) como en el caso de otras microalgas como *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella tertiolecta*, *Thalassiosira pseudonana* (Gordon y Prouse 1973, Fábregas *et al.* 1984, Guerra-Martínez *et al.* 2004) y particularmente cianobacterias (*Synechocystis minuscula*, *Limnothrix* sp., *Agmenellum quadruplicatum*), las cuales se muestran resistentes a concentraciones mayores y en muchas ocasiones los componentes del petróleo pueden servir como nutrientes para su crecimiento (Batterton *et al.* 1978, Silva 1989, Morales-Loo y Goutx 1990, Briceño 2004). Estos resultados muestran que las cianobacterias son más tolerantes que las microalgas eucarióticas al efecto de las fracciones solubles de crudos, lo cual les confiere a las microalgas una mejor selectividad para pruebas toxicológicas.

Otro efecto de la fracción soluble del petróleo sobre las tres microalgas estudiadas fue la disminución en el contenido de clorofila *a* por célula, generalmente con una disminución en más del 20 % en los tratamientos con 50 % de fracción soluble con respecto al control. En las tres microalgas hubo una tendencia de disminución de la clorofila *a* al incrementar la concentración del contaminante, lo cual muestra un efecto en los procesos fotosintéticos. Esta disminución fue evidente a los pocos minutos (1 a 5: período que duró la toma de muestras) de haber tomado las muestras iniciales (equivalentes al tiempo 0 h), indicando que el efecto tóxico sobre las microalgas fue instantáneo. Estos resultados están acorde con Corner (1978) quien demostró que diversos crudos tienen efecto directo en los niveles de clorofila *a*. Esta observación permite soportar la hipótesis que el mayor efecto pudo ocurrir en las primeras 6 h de exposición al contaminante, dada por los efectos observados en la densidad celular. En todo caso, se recomienda la observación de los efectos en las microalgas entre las 0 y 6 h, en función de verificar la hipótesis antes señalada. El obtener una respuesta rápida de las microalgas al efecto del contaminante, como se muestra en nuestros resultados, sugiere un cambio de protocolo en la pruebas de toxicidad con microalgas, antes de las 96h establecidas por otros investigadores (Esclapés 1999, Aidar *et al.* 2002), disminuyendo costos y generando decisiones con mayor celeridad en los demandantes de las pruebas.

Otros estudios muestran también una disminución de la cantidad de clorofila *a* cuando son expuestos a hidrocarburos, tanto en microalgas eucarióticas tipo *Scenedesmus* y *Dunaliella tertiolecta* (Tukaj 1987, Guerra Martínez *et al.* 2004) como en cianobacterias tipo *Limnothrix* sp. y *Synechocystis minuscula* (Briceño 2004).

El efecto tóxico del crudo y de refinados al parecer interfiere más en la cadena transportadora de electrones que en la molécula de clorofila en sí. La disminución del contenido de clorofila *a* y del pico de pigmentos asociados a glucolípidos y monoglicéridos en *Asterionella glaciales*, *Rhodomonas lens* y *Dunaliella tertiolecta* parece estar relacionado con el daño de la estructura de los cloroplastos y la inhibición de la biosíntesis de clorofila (Morales-Loo y Goux 1990).

Los resultados de la presente investigación muestran que las microalgas son afectadas, en cuanto a crecimiento y clorofila *a*, particularmente antes de las 6 horas de exposición a la fracción acuosa de petróleo, siendo la microalga *Dunaliella salina* la que mostró mayor sensibilidad a esta fracción.

AGRADECIMIENTOS

La investigación fue financiada por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente. Se agradece la colaboración técnica de estudiantes y asistentes del Laboratorio de Acuicultura, Extensión Plancton del Instituto Oceanográfico de Venezuela de la Universidad de Oriente.

LITERATURA CITADA

- ABALDE, J., CID A., FIDALGO P., TORRES E. Y HERRERO C. 1995. Microalgas: cultivo y aplicaciones. Monografía N° 26. Universidad de la Coruña, La Coruña.
- AIDAR, E., S. PEREIRA, E. SOUSA Y G. BRASIL-LIMA. 2002. Testes de toxicidade com microalgas. En Nascimento I, Sousa E C y Nipper M. (eds) Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. São Paulo. Editora Artes Gráficas e Indústria. Pp: 51–62.
- AL-HASAN, R., N. SORKHOH, D. AL-BADER Y S. RADWAN. 1994. Utilization of Hydrocarbons by Cyanobacteria from Microbial Mats on Oily Coast of the Gulf. Appl. Microbiol. Biotechnol, 41: 615–619.
- AL-HASAN, R., N. SORKHOH, D. AL-BADER Y S. RADWAN. 1998. Evidence for *n*-Alcane Consumption and Oxidation by Filamentous Cyanobacteria from Oil-Contaminated Coast of the Arabian Gulf. Mar. Biol., 130: 521–527.

- AL-HASAN, R., M. KHANAFER, M. ELIYAS Y S. RADWAN. 2001. Hydrocarbon Accumulation by Picocyanobacteria from the Arabian Gulf. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 533–540.
- ANSARI, Z., M. SALDANHA Y R. RAJKUMAR. 1997. Effects of petroleum hydrocarbons on the growth of a microalga, *Isochrysis* sp. (Chrysophyta). *J. Mar. Sci.* 26: 372–376.
- BATTERTON, J., K. WINTERS Y C. VANBAALEN. 1978. Sensitivity of Three Microalgae to Crude Oils and Fuel Oils. *Mar. Environ. Pollut.*, 1: 31–41.
- BRICEÑO, B. 2004. Cambios fisiológicos y morfológicos de las cianobacterias *Synechocystis minuscula* y *Limnothrix* sp. sometidas a diferentes concentraciones de Queroseno y Fracción Soluble de Petróleo. Tesis de Post-Grado. Facultad Experimental de Ciencias LUZ. Maracaibo.
- CORNER, E.D. 1978. Pollution Studies with Marine Plankton. Part I. Petroleum Hydrocarbons and Related Compounds. *Adv. Mar. Biol.*, 15: 289–380.
- ESCLAPÉS, M. 1999. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas y terrestres. Versión 2.0. Gerencia General de Tecnología, Departamento de Ecología y ambiente. INTEVEP. Caracas. p. 215.
- FÁBREGAS, J., C. HERRERO Y M. VEIGA. 1984. Effect of Oil and Dispersant on Growth and Chlorophyll *a* Content of the Marine Microalga *Tetraselmis suecica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 445–447.
- GAUR, J. Y H. KUMAR. 1981. Growth Response of Four Micro-Algae to Three Crude oils and Furnace Oil. *Environ. Pollut.*, 25: 77–85.
- GORDON, D. Y N. PROUSE. 1973. The Effects of Three Oil on Marine Phytoplankton Photosynthesis. *Mar. Biol.*, 22: 329–333.
- GUERRA-MARTÍNEZ, S., F. MARTÍNEZ, E. RÍOS Y R. OLVERA. 2004. Efecto tóxico del petróleo crudo sobre *Dunaliella tertiolecta*. en Zulpa, G.; Zaccaro, M.; Conforti, V.; Storni, M.; Maidana, N. y Stella, A. Biotecnología algal. Nuevas perspectivas para Latinoamérica. 1^{er} Congreso Latinoamericano sobre biotecnología algal. Proyecto Editorial. Buenos Aires, Argentina.
- JEFFREY, S. Y G. HUMPHREY. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁, and *c*₂ in higher plants, algae and natural populations. *Biochem. Physiol. Pflanz* 167: 191–194.
- LIEBE, B. Y H. FOCK. 1992. Growth and Adaptation of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* on Diesel Exhaust Particle Extracts. *J. General Microbiol.*, 138: 973–978.
- 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. *Mar. Biol.*, 104: 503–509.
- NASCIMENTO, I., E. SOUSA Y M. NIPPER. 2002. Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. São Paulo. Editora Artes Gráficas e Indústria.
- NECHEV, J., S. KHOTIMCHENKO, A. IVANOVA, K. STEFANOV, S. DIMITROVA-KONAKLIEVA, S. ANDREEV Y S. POPOV. 2002. Effect of diesel fuel pollution on the lipid composition of some wide-spread Black Sea algae and invertebrates. *Z. Natur.* 57 (C): 339–343.

- SÁNCHEZ G. Y G. VERA. 2001. Manual introductorio de ecotoxicología acuática. Instituto del Mar de Perú. Informe N° 161. Callao, Perú. p. 82.
- SEMPLE, K., R. CAIN, S. SCHMIDT. 1999. Biodegradation of Aromatic Compounds by Microalgae. FEMS Microbiol. Lett., 170: 291–300.
- SILVA, S. 1989. Efecto de las Fracciones Hidrosolubles del Petróleo sobre el Crecimiento y Asimilación Fotosintética de Microalgas del Lago de Maracaibo. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo. p. 72.
- 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. Environ. Pollut., 47: 9–24.
- VISVIKI, Y. Y W. RACHLIN. 1994. Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium: Effects on ultrastructure. Environ. Contam. Toxicol. 26: 1554–1562.
- WALSH, G., M. YODER, L. LAUGHLIN Y E. LORES. 1987. Responses of marine unicellular algae to brominated organic compound in six growth media. Ecotoxicol. Envir. Safety 14: 215–222.
- WARREN, C. 1971. Biology and water pollution control. Philadelphia, W. B. Saunders CO.
- ZAR, J. 1984. Biostatistical análisis. Prentice Hall, Englewoods Cliff, New Jersey, USA. p. 669.

