

**INFLUENCIA DEL pH SOBRE EL EFECTO TÓXICO INDUCIDO EN CLONES DE
DICTYOSPHAERIUM CHLORELLOIDES SENSIBLES Y RESISTENTES A CROMO
(VI)**

**INFLUENCE OF pH ON THE TOXIC EFFECT INDUCED IN SENSITIVE AND
RESISTANT CHROMIUM (VI) STRAINS OF *DICTYOSPHAERIUM*
*CHLORELLOIDES***

María Pereira Martín, Ana D'Ors de Blas, Sebastián Sánchez-Fortún Rodríguez

Departamento de Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad
Complutense de Madrid

Resumen

El presente estudio establece una correlación entre las variaciones de pH en el medio y las concentraciones de Cromo (VI), mediante su efecto en poblaciones de *Dictyosphaerium chlorelloides*, microalgas eucariotas cosmopolitas de agua continental.

Se cultivaron en medio BG11 dos clones de *D. chlorelloides*, uno sensible al Cr (VI) y otro resistente a concentraciones de 25 µg/ml, en un rango de pH entre 2,5 y 11 para determinar el efecto de la acidez. Habiendo establecido un rango de pH definitivo (3-7,5), realizamos los ensayos de toxicidad para obtener el valor de pH mínimo al que la población de microalgas no sufría variaciones estadísticamente significativas.

El análisis de la exposición a Cr (VI) evidenció una NOEC ajustada al valor de pH=4,25 para ambos clones. Los valores de CI₅₀₍₇₂₎ obtenidos a pH 7,5 y 4,25 evidenciaron variaciones estadísticamente significativas entre ambos valores de pH, no habiendo diferencias significativas relativas al crecimiento poblacional en la cepa sensible de *D. chlorelloides*, aunque sí en el clon resistente.

Palabras clave: *D. chlorelloides*, pH, toxicidad, Cr (VI).

Summary

This paper explains the relationship between the environmental variations of pH and Chromium (VI) concentration, by their effect on populations of *Dictyosphaerium chlorelloides*, eukaryotic cosmopolitan microalgae of fresh water ecosystems.

Two strains of *D. chlorelloides* were cultured in BG11 culture medium, being one of them sensitive to Cr (VI) and the other one resistant up to concentrations of 25 µg/ml, at pH values

between 2.5 and 11 in order to determine their viability. When the pH range was determined (3-7.5), toxicity assays were done to obtain the minimum value of pH in which the microalgal populations did not vary significantly.

The analysis of Cr (VI) exposure demonstrated a NOEC fitted to the pH value of 4.25. The IC₅₀₍₇₂₎ values obtained at pH 7.5 and 4.25 showed significant statistic variations between both pH values, and there were not significant differences related to community growth in the sensitive strain, unlike the resistant one.

Keywords: *D. chlorelloides*, pH, toxicity, Cr (VI).

Introducción

Las algas son, por formar parte de los productores primarios en ecosistemas acuáticos, organismos idóneos para el estudio de la calidad del agua y sus repercusiones medioambientales (Janssen y Heijerick, 2003). Las algas de la clase *Chlorophyceae*, vulgarmente conocidas como algas verdes, forman parte del fitoplancton en todo tipo de aguas, sea en formas aisladas o formando biofilms (Reynolds, 1984; Happey-Wood, 1988; Orlík, 1994). En muchos estudios, tanto cualitativos como cuantitativos, hay una gran proporción de especies del orden *Chlorococcales* (Hecky y Kling, 1981; Krienitz y Scheffler, 1994; Padišák y Dokulil, 1994; Trifonova, 1998).

Muchas de las clorofíceas son características, en especial clorococales y zignemofitas, por soportar un amplio espectro de concentración salina (Hammer *et al.*, 1983; Orlík, 1994). *Dictyosphaerium chlorelloides* es un alga clorofíceas cosmopolita que forma parte del fitoplancton de ríos y estuarios, ya que posee gran poder adaptativo a las concentraciones de sal (Bartolomé *et al.*, 2008)

Es sabido que la toxicidad de los metales en hábitats acuáticos depende de las características físico-químicas del agua, tales como la materia orgánica en suspensión, el pH, la proporción de gases disueltos y la dureza de la misma (Janssen, 2000; Paquin, 2002). En concreto, existen estudios donde se afirma la existencia de competencia entre los iones metálicos y los protones del agua; debido quizás a que comparten sitio de unión en la membrana externa, denominado “ligando biótico” (Meyer, 1999; McRae, 1999; De Schamphelaere *et al.*, 2005).

El cromo es un elemento químico de número atómico 24 que se encuentra en el grupo 6 de la tabla periódica. Su grado de oxidación más alto es el +6, y compuestos químicos que contengan cromo hexavalente [Cr (VI)] son muy oxidantes, y en niveles no letales el Cr (VI) es carcinógeno. La mayoría de los compuestos de Cr (VI) irritan los ojos, la piel y las mucosas. La exposición crónica a compuestos de Cr (VI) puede provocar daños permanentes

en los ojos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda desde 1958 una concentración máxima de 0,05 mg/litro de Cr (VI) en el agua de consumo. Este valor ha sido revisado haciendo nuevos estudios sobre sus efectos en la salud, pero ha permanecido constante.

Debido a que en trabajos anteriores se ha podido obtener y mantener en el laboratorio poblaciones de *D. chlorelloides* resistentes a altas concentraciones de Cr (VI) en el medio (Sánchez-Fortún *et al.*, 2009), el objetivo de este trabajo es determinar si existen variaciones de toxicidad dependientes del pH, entre dos clones de *D. chlorelloides*, uno sensible a la presencia de Cr (VI) en el medio, y otro resistente a concentraciones de 25 µg/ml de Cr (VI).

Material y Métodos

El efecto de inhibición del crecimiento celular, provocado por Cr (VI) a diferentes valores de pH en el medio, y sobre dos clones de *D. chlorelloides*, uno sensible (DcCrS) y otro resistente (DcCrR25) a concentraciones de 25 µg/ml de Cr (VI), ha sido evaluado en el presente trabajo. Las células de ambos clones se cultivaron en frascos Greiner[®], y posteriormente en tubos de cultivo de poliestireno de doble cierre, donde se produce el adecuado intercambio de gases. El medio de cultivo utilizado fue BG11, una mezcla estandarizada de minerales y nutrientes para el cultivo de microalgas de agua dulce (pH 7,5), modificado con HCl 0,1 N y NaOH 0,1 M para obtener los valores de pH necesarios en cada ensayo.

Los cultivos se mantuvieron en estufa a 22° C, con iluminación en régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. En cuanto al estudio de la toxicidad producida por Cr (VI), usamos una dilución madre de trióxido de cromo (CrO₃) de 100 µg/ml.

Determinación del rango de pH seguro

Realizamos un ensayo a una sola réplica que nos permitió conocer entre qué valores de pH siguen multiplicándose las células, y si existen diferencias entre ambos clones. Los resultados obtenidos fueron usados como referencia para los siguientes experimentos, con el fin de discriminar esta toxicidad por medio ácido de la producida por el cromo.

Para ello, valores de pH de 3, 5, 9 y 11 fueron analizados en ensayos previos, con objeto de determinar el rango de pH posterior al que se realizarían los ensayos para determinar la inhibición provocada en el crecimiento de las poblaciones microalgales. Adicionalmente, se realizaron estudios paralelos con pH de 7,5, por ser el valor referencia que tomaríamos como control.

Realizando controles de crecimiento mediante recuento celular en cámara de Neubauer cada 72 horas, quedó establecido que ambos clones se ven afectados por medios ácidos, mientras que los valores básicos, hasta el pH de 9 estudiado, no provocaban disminuciones

significativas de crecimiento celular, respecto a los valores control. En función de estos resultados la escala de pH quedó acotada a valores de 3,5, 4, 4,5 y 5, para el estudio de inhibición del crecimiento.

Con los resultados obtenidos, se realizó una curva concentración-respuesta, y mediante ANOVA de una sola vía se obtuvo, tanto el valor de inhibición medio ($pH_{50(72)}$) como la correspondiente máxima concentración con la que no se apreciaba disminución en el crecimiento de los cultivos respecto al control (NOEC).

Determinación de la toxicidad producida por Cr (VI)

A la vista de los valores obtenidos se efectuaron dos series de ensayos para el clon sensible (DcCrS), uno de ellos con valor de pH 7,5 y otro con el valor de pH coincidente con el valor de NOEC. Dichos sets se conformaron con concentraciones crecientes de Cr (VI), del orden de 0,5, 1, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$.

Con el clon resistente (DcCrR25) se efectuó una relación dosis-respuesta con diferentes concentraciones de Cr (VI), para posteriormente realizar dos ensayos con valores de pH de 7,5 y el correspondiente a la NOEC, del orden de 25, 30, 40, 50 y 60 $\mu\text{g/ml}$. Cada 72 horas se realizaron controles de crecimiento por recuento celular en cámara de Neubauer.

Resultados

El análisis de los resultados obtenidos para exposiciones a Cr (VI) sobre diferentes valores de pH evidenció una NOEC ajustada al valor de $pH=4,25$. Los valores de concentración inhibitoria media a 72 horas ($CI_{50(72)}$), junto con sus correspondientes límites de confianza al 95% (LC 95%), obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda realizados con ambos clones, quedan resumidos en la Tabla 1.

| Clon de | n | $CI_{50(72)}$ (LC 95%), ($\mu\text{g/ml}$) | |
|----------------|---|--|------------------------|
| | | pH 7.5 | pH 4.25 |
| DcCrS | 4 | 1,97 (1,65-2,48) | 1.33 (0,63-2,11) |
| DcCrR25 | 4 | 59,31 (49,27-81,10) | 112,20 (100,00-131,82) |

Tabla 1. Concentración inhibitoria media tras 72 horas de exposición ($CI_{50(72)}$), con sus correspondientes límites de confianza al 95 % (LC 95%), obtenida para cada uno de los dos clones de *D. chlorelloides* estudiados, uno sensible (DcCrS) y otro resistente (DCCrR25) a concentraciones de 25 $\mu\text{g/ml}$ de Cr(VI). Los valores corresponden a la media obtenida de cuatro ensayos (n=4) y expresados en $\mu\text{g/ml}$.

Estos resultados y el análisis de regresión lineal realizado pusieron en evidencia que existen variaciones estadísticamente significativas entre los valores obtenidos entre ambos clones de *D. chlorelloides*, tanto en medios a pH 7,5 (Figura 1) como en medios a pH 4,25 (Figura 2). Los valores de $CI_{50(72)}$ obtenidos tanto a pH 4,25 como a 7,5 mostraron variaciones estadísticamente significativas entre ambos puntos de pH (Figura 3). Existe un desplazamiento en la gráfica hacia la derecha en las figuras 1 y 2 correspondiente a los resultados obtenidos con DcCrR25, lo cual demuestra que la viabilidad celular no se ve afectada por la conjunción de la exposición crónica a Cr (VI) y la acidez del medio en este clon. Sin embargo, en el clon sensible (DcCrS) la toxicidad al Cr (VI) es similar para ambos valores de pH.

Discusión

Mediante los resultados obtenidos en el presente experimento se ha podido observar cómo la variación en los sistemas de captación de iones de la pared celular, debido al efecto que provoca la alteración del pH de la misma, puede alterar los mecanismos de absorción de Cr (VI).

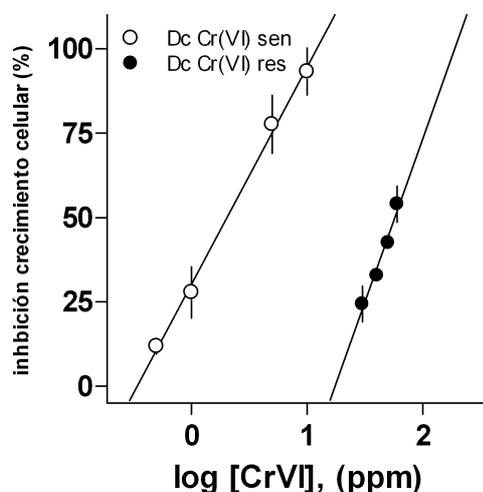


Figura 1. Inhibición del crecimiento celular inducido por exposiciones a Cr (VI) en medio a pH de 7,5 sobre poblaciones de *Dictyosphaerium chlorelloides* sensibles (○) y resistentes (●). Los puntos representan las medias con su correspondientes desviaciones estándar (n = 4).

De Schamphelaere *et al.* (2003) sostienen que el número de sitios de unión que se hayan desprotonados en la superficie del alga aumentan conforme aumenta el pH del medio.

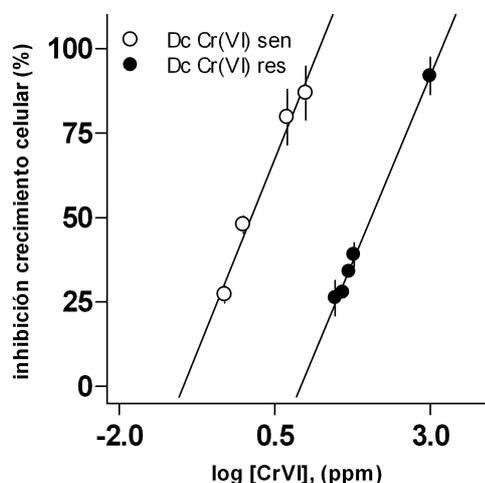


Figura 2. Inhibición del crecimiento celular inducido por exposiciones a Cr (VI) en medio a pH de 7,5 sobre poblaciones de *Dictyosphaerium chlorelloides* sensibles (○) y resistentes (●). Los puntos representan las medias con su correspondientes desviaciones estándar (n = 4).

Ello puede provocar una situación de competencia entre los iones metálicos disueltos en el medio en función de los diferentes pK_a . En el caso del cobre, por ejemplo, un aumento de pH induce una mayor toxicidad por la unión extracelular del mismo a la pared microalgal, reduciendo muchas veces la concentración efectiva media (EC_{50}) del cobre hasta en un 39% (De Schamphelaere *et al.*, 2005). Franklin *et al.* (2000) reprodujeron la experiencia con *Chlorella sp.*, midiendo además la concentración intracelular de cobre y de la superficie, con los mismos resultados.

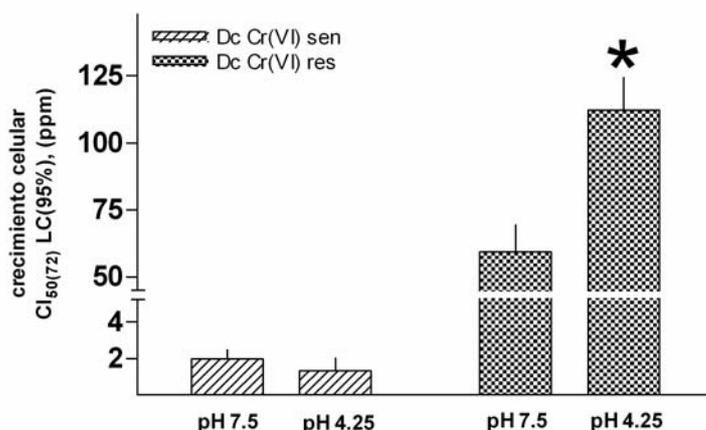


Figura 3. Comparación entre los valores de concentración inhibitoria media ($CI_{50(72)}$) obtenidos para ambos clones de *Dictyosphaerium chlorelloides* estudiados a pH de 7,5 y 4,25. El símbolo (*) representa diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre el valor de la columna y su homólogo correspondiente.

En nuestro ensayo observamos que para el clon DcCrS la toxicidad al Cr (VI) es similar tanto a pH control como a 4,25, no existiendo variaciones estadísticamente significativas; la tasa de crecimiento celular está disminuida (Figura 3). En cambio, para el clon DcCrR25 advertimos que a pH ácido (4,25) existe un aumento de la tasa de crecimiento celular estadísticamente significativo en relación con el valor de pH control (7,5).

Bajo esta perspectiva, los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían explicar la posibilidad de que la pared celular regule las variaciones de osmolaridad producidas por el pH ácido, de tal modo que por una protonación de los sitios de unión de la pared, ésta no pueda captar los iones metálicos del Cr (VI).

Conclusiones

En conclusión, los medios alcalinos (hasta pH 11) son perfectamente tolerados por estas microalgas, y sin embargo, por debajo de pH 4,25 se produce un efecto inhibitor del crecimiento celular concentración-dependiente. El Cr (VI) se comporta como tóxico para ambos clones de *D. chlorelloides* estudiados.

Según la clasificación de la Environmental Protection Agency (EPA), y basándonos en los resultados expuestos en la tabla 1, por su efecto en DcCrS a pH 7,5 y 4,25 el Cr (VI) resulta un compuesto muy tóxico. En cambio, para el clon resistente el Cr (VI) supone un compuesto

moderadamente tóxico a pH 7,5, mientras que a pH 4.25 es considerado un compuesto poco tóxico. Finalmente, el clon DcCrR25 es capaz de soportar ambientes ricos en Cr (VI) a pH ácido en un orden de magnitud casi 100 veces mayor que el clon sensible.

Bibliografía

Bartolomé, M.C., D'ors, A., Sánchez-Fortún, S. (2009). Toxic effects induced by salt stress on selected freshwater prokaryotic and eukaryotic microalgal species. *Ecotoxicology*: 18, 174-179.

De Schamphelaere, K. A. C., Vasconcelos, F. M., Heijerick, D. G., Tack, F. M. G., Delbeke, K., Allen, H. E., Janssen, C. R. (2003). Development and field validation of a predictive copper toxicity model for the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem*: 22, 2454-2465.

De Schamphelaere, K.A.C., Stauber, J.L., Wilde, K.L., Markich, S.J., Brown, P.L., Franklin, N.M., Creighton, N.M., Janssen, C.R. (2005). Toward a biotic ligand model for freshwater green algae: Surface-bound and internal copper are better predictors of toxicity than free Cu^{2+} ion activity when pH is varied. *Environ Sci. Tech*. 39: 2067-2072.

Franklin, N. M., Stauber, J. L., Markich, S. J., Lim, R. P. (2000). pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquat. Toxicol*: 48, 275-289.

Hammer, U. T., Shames, J., Haynes, R. G. (1983). The distribution and abundance of algae in saline lakes of Saskatchewan, Canada. *Hydrobiologia* 105: 1-27.

Happay-Wood, C. M. (1988). Ecology of freshwater planktonic green algae. In Sandgren, C. D. (ed.), *Growth and Reproductive Strategies of Freshwater Phytoplankton*. Publishers, Cambridge: 175-226.

Hecky, R.E. y Kling, H-J. (1981). The phytoplankton and protozooplankton of the eutrophic zone of Lake Tanganyika: species composition, biomass, chlorophyll content and spatio-temporal distribution. *Limnol. Oceanogr*. 26: 548-564.

Janssen, C.R., De Schamphelaere, K.A.C., Heijerick, D., Muysen, B., Lock, K., Bossuyt, B., Vangheluwe, M., Van Sprang, P. (2000). Uncertainties in the environmental assessment of metals. *Hum. Ecol. Risk Assess*. 6: 1003-1018.

Janssen, C.R. y Heijerick, D.G.. (2003). Algal toxicity testing for environmental risk assessments of metals: Physiological and ecological considerations. *Rev. Environ. Contam. Toxicol*. 178: 23-52.

Krienitz, L. y Sheffler, W. (1994). The Selenastraceae of the oligotrophic lake Stechlin (Brandenburg, Berlin). *Biología (Bratislava)* 49: 463-472.

- MacRae, R. K., Smith, D. E., Swoboda-Colberg, N., Meyer, J. S., Bergman, H. S. (1999). The copper binding affinity of rainbow trout (*Onchorrhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*) gills: Implications for assessing bioavailable metal. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1180-1189.
- Meyer, J. S., Santore, R. C., Bobbit, J.P., Debrey, L.D., Boese, C. J., Paquin, P. R., Allen, H. E., Bergmann, H. L., Di Toro, D. (1999). Binding of nickel and copper to fish gills predicts toxicity when water hardness varies, but free ion activity does not. *Environ. Sci. Technol.* 33: 913-916.
- Olrik, K. (1994). *Phytoplankton – Ecology*. Ministry of the Environment, Denmark. Danish Environmental Protection Agency: 183 pp.
- Padisák, J. y Dokulil, M. (1994). Contribution of green algae to the phytoplankton assemblage in a large, turbid shallow lake (Neusiedlersee, Austria/Hungary). *Biológia (Bratislava)* 49: 571–580.
- Paquin, P. R., Gorsuch, J. W., Apte, S., Batley G. E, Bowles , K. C., Campbell , P. G. C., Delos, C. G., Di Toro, D. M., Dwyer, R. I., Galvez, F., Gensemer, R. W., Goss, G. G., Hogstrand, C., Janssen, C. R., McGeer, J. C., Naddy, R. B., Playle, R. C., Santore, R. C., Scheneider, U., Stubblefield, W. A., Wood, C. M., Wu, K. B. (2002). The biotic ligand model: A historical overview. *Comp. Biochem. Physiol. C: Comp, Pharmacol.* 133: 3-36
- Reynolds, CS. 1984. *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge: 384 pp.
- Sánchez-Fortún, S, López-Rodas, V., Navarro, M., Marvá, F., D'ors, A., Rouco, M., Haigh-Florez, D, Costas, E. (2009). Toxicity and adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* to extreme chromium contamination. *Environ. Toxicol. Chem.* (doi: 10.1897/08-489.1).
- Trifonova, I. 1998. Phytoplankton composition and biomass structure in relation to trophic gradient in some temperate and subarctic lakes of north-western Russia and the Prebaltic. En Alvarez-Cobelas, M., Reynolds, C. S.; Sánchez-Castillo, P.; Kristiansen, J. (eds.). *Phytoplankton and Trophic Gradients. Developments in Hydrobiology* 129. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 99–108. Reimpreso de *Hydrobiologia* 369/370.