

## EFECTO TÓXICO DEL CARBARIL Y DEL PLOMO SOBRE LOS LÍPIDOS, LA CLOROFILA Y LOS AZÚCARES REDUCTORES DE LA MICROALGA *Ankistrodesmus falcatus*

Laura MARTÍNEZ-TABCHE, Celia GERMÁN-FAZ, Ignacio GALAR-CASTELÁN, Beatríz RAMÍREZ-MORA y Guadalupe CARDONA-HINOJOSA

Laboratorio de Toxicología Acuática, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Depto. de Farmacia, IPN. Apdo. Postal 11340. México D.F.

(Recibido diciembre 1994, aceptado septiembre 1996)

Palabras clave: carbaril, plomo, lípidos, azúcares, *Ankistrodesmus falcatus*

### RESUMEN

La toxicidad del carbaril (CA) y del plomo (Pb), contaminantes de diferentes cuerpos de agua, es estimada comúnmente mediante la determinación de la  $CL_{50}$  en *Daphnia magna* o por la concentración en el agua; sin embargo, estos métodos presentan desventajas para observar interacciones bioquímicas que repercuten en el efecto tóxico, por lo que el objetivo de este trabajo fue desarrollar un método rápido, económico y sensible que permita evaluar la toxicidad de la mezcla de los contaminantes antes mencionados a través de la concentración de lípidos, clorofila y azúcares reductores de la microalga *Ankistrodesmus falcatus*. A los lotes de la microalga se les adicionaron distintas cantidades de Pb, CA y la mezcla de ambos. Después de 72 h, se determinó en la biomasa la concentración de clorofila, azúcares reductores y lípidos. Los resultados mostraron que la mezcla del Pb-CA produce mayor efecto sobre los biomarcadores del daño que los xenobióticos aislados, por ello se sugiere considerar la existencia de un efecto sinérgico entre los mismos para establecer los límites permitidos de estos contaminantes.

### ABSTRACT

Carbaryl (CA) and lead (Pb) are widely recognized as water pollutants. Its toxicity is evaluated by  $LC_{50}$  in *Daphnia magna* or by concentration in water. However, these are not very sensitive methods. Therefore, the objective of this study is to evaluate the toxicity of a mixture of these contaminants by a reliable, rapid, cheap and sensitive method. We selected the lipids, chlorophyll and reductor sugars concentration of *Ankistrodesmus falcatus*. Different concentrations of lead, carbaryl and mixture of both pollutants were added to different lots of algae. Chlorophyll, reducted sugar and lipid concentration were determined after the toxification period. The Pb-CA mixture produces a major effect on biochemical parameters than xenobiotics by themselves and it has been suggested that, to establish permissible limits, the synergism presented in simultaneous exposure to both xenobiotics must be considered.

### INTRODUCCIÓN

La presencia simultánea de dos o más xenobióticos en el agua puede modificar la respuesta tóxica a uno o más de ellos, dando como resultado sinergismo o antagonismo (Rand y Petrocelli 1984); estos efectos se manifiestan principalmente con sustancias que actúan sobre el mismo receptor o modifican los procesos temporales que determinan la concentración mínima efectiva en el órgano blanco (Ariens 1978, Marking 1989). En muchas ocasiones las mezclas de contaminantes están presentes en concentraciones muy pequeñas, que no son capaces

de producir un efecto evidente sobre un órgano o tejido, pero sí pueden modificar los mecanismos bioquímicos que participan en la homeostasis de los hidrobiontes y por consiguiente repercutir en el crecimiento y la reproducción de los mismos.

Los indicadores bioquímicos son empleados para estimar cuantitativamente el efecto subletal provocado por los xenobióticos aislados o en mezclas, cuando un organismo es expuesto aguda o crónicamente a compuestos que se encuentran en efluentes potencialmente tóxicos, por lo que podrían ser utilizados como indicadores de la calidad del agua (Hill *et al.* 1993).

Para llevar a cabo estos estudios es necesario seleccionar un organismo de relevancia ecológica y de fácil manejo (Hill *et al.* 1993). Las microalgas son productores primarios, forman parte de diversas cadenas alimenticias y pueden detectar y responder a cambios que se llevan al cabo en el medio. Son diversos los estudios que han utilizado parámetros bioquímicos de estos microorganismos para determinar el impacto ambiental. Lewis (1991) empleó la fotosíntesis para evaluar el efecto de los detergentes en poblaciones de *Selenastrum* y de *Scenedesmus*, por ser un indicador del estado de desarrollo de estas microalgas. Por otra parte, Saroja y Bose (1984) usaron este mismo parámetro para detectar el efecto del metilparatión sobre *Chlorella protothecoides*.

Los lípidos, además de ser los principales componentes de las membranas de estos microorganismos, participan en diversos procesos bioquímicos y son blanco de distintos xenobióticos. Estudios realizados por Burden *et al.* (1990), demostraron que metales pesados, fungicidas, herbicidas, etc., inducen modificaciones en las funciones de las membranas, formando complejos con los grupos funcionales de diversos metabolitos primarios de los xenobióticos. Otros contaminantes pueden causar daño a las membranas a través de procesos de lipoperoxidación o bien, al interferir en la biosíntesis de sus componentes, como es el caso de la microalga *Ankistrodesmus falcatus* cuando se expone al herbicida paraquat (Martínez-Tabche *et al.* 1992).

Entre los principales contaminantes de las aguas residuales y de otros sistemas acuáticos están metales como Hg, Mn, Cr, Co, Cd y Pb, este último, aunque se considera como moderadamente tóxico, persiste por largo tiempo en los organismos, lo que provoca que se bioconcentre y produzca efectos tóxicos sobre la biota (Pérez y Deleón 1993). También retarda el flujo de electrones en las mitocondrias y en los cloroplastos (Koeppel y Miller 1970, Bazzoz y Govindjee 1974), lo que puede ocasionar efectos deletéreos sobre la respiración y la fotosíntesis, como lo demuestra la concentración media de inhibición del crecimiento ( $CE_{50}$ ) del Pb en la microalga *Phaeodactylum nutum* y *Platymonas subcordiformis*, cuyos valores son 7.5 y 10 mg/L de Pb, respectivamente (Rand 1984).

El carbaril (CA) es un insecticida carbámico de amplio espectro, cuya persistencia en el medio depende de la proporción de microorganismos presentes en el agua, de la temperatura y del pH. En un cuerpo de agua cuyo pH fluctúa entre 7.0 y 7.4, la vida media de este plaguicida es de 10.5 días; sin embargo, a pH 8.0 su degradación es de 1.8 días (Aly y El-Dib 1971). Su toxicidad se debe principalmente a la inhibición de la acetilcolinesterasa (Atwoot 1982); también modifica el crecimiento de diversos organismos (Wochok y Welch 1976). Cremlin (1986) señala que este plaguicida inhibe la reacción de Hill en diferentes vegetales. Kumar *et al.* (1991) demostraron que la concentración de ácidos nucleicos y proteínas del alga *Nostoc murcorum* disminuyeron al exponer a la microalga por 96 h al bentiocarbamilo. La  $CE_{50}$  del CA evaluada en esta microalga

fue de 2 mg/L (Kuhr y Dorough 1976).

*Ankistrodesmus falcatus* es una microalga unicelular filamentosa que pertenece a la familia Chlorellaceae, de forma acicular, con una longitud promedio de 45  $\mu\text{m}$  y una anchura máxima de 4  $\mu\text{m}$  (Martínez-Jeronimo y Espinoza-Chávez 1994); son células individuales, largas, que se agregan en grupos pequeños, cada una contiene un núcleo mediano, con cloroplastos parietales sin pirenoide, además es un constituyente de diversas cadenas tróficas (Martínez-Tabche *et al.* 1994).

En este trabajo se estudió el efecto de las mezclas del CA-Pb sobre azúcares reductores, clorofila y lípidos de *Ankistrodesmus falcatus*, con el propósito de determinar la existencia de interacciones sinérgicas entre ambos xenobióticos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Ankistrodesmus falcatus* fue colectada del Lago de Chapultepec (México D.F.), se purificó por dilución y cultivó sobre placas de agar por estría cruzada y asa acodada en medio de Kessler ( $\text{NaNO}_3 = 250 \text{ mg/L}$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 25 \text{ mg/L}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 75 \text{ mg/L}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 75 \text{ mg/L}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 175 \text{ mg/L}$ ;  $\text{NaCl} = 25 \text{ mg/L}$ ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 4.98 \text{ mg/L}$ ;  $\text{H}_2\text{SO}_4 = 1.84 \text{ mg/L}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3 = 11.92 \text{ mg/L}$ ; EDTA = 50 mg/L; KOH = 31 mg/L;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 8.92 \text{ mg/L}$ ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} = 1.44 \text{ mg/L}$ ;  $\text{MoO}_3 = 0.71 \text{ mg/L}$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} = 1.57 \text{ mg/L}$ ;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} = 0.49 \text{ mg/L}$ ). Se mantuvieron constantes la iluminación (1,900 luxes), pH (7.4), dureza (0.5 mM), la aireación y la temperatura ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Las fases del crecimiento lag, log y estacionaria de *Ankistrodesmus falcatus* se alcanzaron a 1, 6 y 13 días respectivamente.

Para el cultivo patrón se utilizaron 10 matraces Erlenmeyer que contenían 2700 ml de medio de Kessler y se inocularon con 300 ml del cultivo monoespecífico de *A. falcatus*, cada uno bajo condiciones de esterilidad; se incubaron por 6 días a temperatura ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ), aireación e iluminación constantes (1900 luxes). Todos los experimentos se realizaron en condiciones estáticas de 72 h sin renovación. A la mitad de la fase log de crecimiento del alga (6 días) se tomaron 200 ml de cada matraz a los cuales se les adicionaron diferentes concentraciones de Pb (Mallinckrodt, reactivo analítico), carbaril (Sevin técnico, pureza de 99.15% Union Carbide, México) y mezclas de ambos. En estas condiciones experimentales de pH y dureza, González *et al.* (1992) demostraron que el insecticida es estable por lo menos una semana. Para todos los bioensayos se siguió el procedimiento descrito por Munawar (1987).

Como testigos para los lotes contaminados con Pb, se utilizaron inóculos con medio de Kessler (T-I) y para los expuestos con CA y las mezclas, se emplearon inóculos con medio de Kessler y 0.5 ml/ml de acetona (disolvente del carbaril) (T-II). Las concentraciones del metal y del insecticida fueron las siguientes:

Pb: 17, 34 y 68 ppm. Estas concentraciones que se han encontrado en diferentes cuerpos de agua muy contaminados por este metal, hasta 1360 veces más que el límite permisible establecido (0.05 ppm) (Whitton 1984) y en sedimentos (Shehan 1984), así como en lodos residuales (Ortiz-Hernández *et al.* 1994, Siebe 1994).

Carbaril: 25, 50 y 75 ppm. Estos niveles que se han detectado en suelos inundados (Muralekrishna y Venkateswarhi 1984) y los informados como residuos máximos permisibles en diferentes cultivos agrícolas de México (Diario Oficial 1991). Estas concentraciones son muy altas con relación a los límites permisibles establecidos para este insecticida (0.09 mg/L), sin embargo, por los procesos de lixiviación o eliminación directa a cuerpos de agua, pueden hallarse estas cantidades en lugares puntuales de los sistemas acuáticos.

Mezclas de Pb-Ca: 17-25, 34-50 y 68-75 ppm, respectivamente.

Todos los matraces se colocaron en las mismas condiciones de aireación, temperatura e iluminación del cultivo patrón. En los lotes se mantuvo el volumen constante (250 ml) con el medio de Kessler durante todo el estudio. Los períodos de intoxicación fueron de 24, 48 y 72 h, estos tiempos se seleccionaron para detectar y cuantificar el efecto inicial del CA, Pb y sus mezclas.

Para considerar el efecto producido por estos xenobióticos sobre la microalga se determinó la concentración de clorofila, azúcares reductores y lípidos en el paquete celular; este último también se cuantificó en el medio Kessler (medio en donde se expuso la microalga a Pb, CA y sus mezclas). Estos biomarcadores se eligieron por estar relacionados con el metabolismo intermediario de la microalga, por lo que hay la probabilidad de que al dañarse una ruta metabólica el efecto ocasiona modificaciones en vías alternas, además existen informes de que tanto el CA como el Pb alteran la síntesis del pigmento fotosintético (Koepe y Miller 1970, Creblynn 1986).

Para la evaluación de estos parámetros se tomaron 60 ml de la suspensión del alga de cada matraz, que se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos y al paquete celular se le estableció la concentración de clorofila, lípidos y azúcares reductores. La determinación de clorofila se realizó por el método de Liasen-Jessen (Liasen-Jessen and Jessen 1971), que se fundamenta en la solubilidad de la clorofila en acetona al 80% y su absorbencia característica al espectro. Al paquete celular se le efectuó la extracción (por triplicado) del pigmento con 2 ml de acetona al 80 % y los extractos orgánicos se leyeron a 663 y 645 nm en un espectrofotómetro Varian DMS-90. Los azúcares reductores se determinaron por el método de la antrona (Yemm y Willis 1954), el paquete celular obtenido de cada lote se resuspendió en 3 ml de una mezcla de cloroformo-metanol (1:2), se agitó y se refrigeró durante 24 h. Esta suspensión se centrifugó a 3500 rpm por 5 min, se expuso al ultrasonido durante 10 min y se centrifugó nuevamente a 3500 rpm por 10 min. A 500 µl del sobrenadante se le añadieron 2.0 ml del reactivo de antrona (200 mg de antrona en 100 ml de ácido sulfúrico concentrado), se calentó

a 80° C durante 15 minutos se enfrió y se leyó la absorbencia del complejo colorido formado, a 630 nm. Los lípidos tanto en el medio de cultivo (medio Kessler) como en la biomasa se cuantificaron por el método de fosfovainillina (Postma y Stroes 1968). A 5 ml del medio y al paquete celular, se les adicionaron 2.5 ml de ácido sulfúrico concentrado y se agitaron en el vortex por un minuto; los tubos se taparon y se sometieron a ebullición durante 10 minutos en un baño de agua a temperatura constante. Del producto de oxidación ácida se tomaron 50 µL y se añadió 2.5 ml de reactivo de fosfovainillina (1.2 g de vainillina se disolvieron en 1000 ml de ácido fosfórico concentrado), posteriormente se incubó a 37° C durante 10 min. Los tubos se enfriaron a temperatura ambiente. La absorbencia del complejo colorido se midió a una longitud de onda de 540 nm. Estos datos se interpolaron en una curva tipo de aceite de oliva (aceite diluido en cloroformo a concentraciones de 1, 2, 4 y 6 mg/ml).

Todos los ensayos se realizaron por quintuplicado. Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y la diferencia entre medias se contrastó por la prueba de Duncan.

## RESULTADOS

### Efecto del Pb, CA y sus mezclas sobre la concentración de clorofila

La concentración de clorofila en los cultivos expuestos durante 24 y 48 h a diversas concentraciones de Pb no presentó diferencias significativas con respecto al testigo I, excepto a la concentración de 34 ppm/24 h. En los lotes tratados con 17, 34 y 68 ppm de Pb a las 72 h resultó una disminución de la concentración del pigmento de 37, 20 y 51 %, respectivamente ( $p < 0.01$ ) al compararlos con el lote testigo I (Tabla I).

TABLA I. EFECTO DE CARBARIL, PLOMO Y SUS MEZCLAS SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA (µg/mg de biomasa seca) DE *Ankistrodesmus falcatus*

TRATAMIENTOS (µg/l)		24 h	48 h	72 h
TESTIGOS	I	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.001	0.35 ± 0.01
	II	0.43 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.44 ± 0.01
Pb	17	0.40 ± 0.02	0.38 ± 0.03	0.22 ± 0.01
	34	0.28 ± 0.01	0.41 ± 0.02	0.28 ± 0.07
	68	0.49 ± 0.09	0.36 ± 0.01	0.17 ± 0.01
CARBARIL	25	0.48 ± 0.08	0.43 ± 0.02	0.74 ± 0.01
	50	0.97 ± 0.01	0.45 ± 0.04	0.36 ± 0.02
	75	0.93 ± 0.01	0.48 ± 0.03	0.32 ± 0.02
Pb-CA (17-25)		0.16 ± 0.03	0.27 ± 0.01	0.53 ± 0.06
	Pb-CA (34-50)	0.18 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.32 ± 0.01

Cada valor representa la media de 5 experimentos ± E.E.

En los cultivos de *A. falcatus* expuestos por 24 h a 50 y 75 ppm de carbaril, se elevó la concentración de clorofila en 126 y 116 % ( $p < 0.01$ ) con respecto al testigo II. A las 48 h en las tres concentraciones del plaguicida (25, 50 y 75 ppm) disminuyó la cantidad del pigmento en 13, 9 y 3 % con respecto al lote testigo II. Este mismo efecto se apreció a las 72 h en los lotes con 50 y 75 ppm de CA, ya que la clorofila descendió 16 y 25 %, respectivamente. Sin embargo, al mismo tiempo de exposición, pero a la concentración de 25 ppm de CA, el pigmento aumentó en 69 % (Tabla I). En los lotes de microalgas expuestos a las mezclas de 17-25 y a la de 34-50 de Pb-CA durante 24 y 48 h la concentración de clorofila disminuyó en 61 y 56 %. A las 48 h de exposición en estas mezclas el pigmento resultó menor en 45 y 50 % que el testigo II. Sin embargo, a las 72 h en la mezcla de Pb-CA (17-25) se elevó en 21 % y en la de Pb-CA (34-50) decreció en 25 % ( $p < 0.01$ ) (Tabla I).

### Efecto sobre azúcares reductores

Los lotes de *A. falcatus* expuestos a 17 ppm de Pb durante 24 y 48 h no mostraron diferencias significativas en la cantidad de azúcares con respecto al testigo I, a las 72 h, estas biomoléculas aumentaron en 93 %. Los lotes tratados con 34 ppm de Pb durante 24 y 48 h, presentaron disminución del 23 y 7 % pero en los expuestos a 72 h los azúcares aumentaron en 70% al compararlos con el lote testigo I ( $p < 0.05$ ). Para la concentración de 68 ppm de Pb a las 24, 48 y 72 h estos compuestos se incrementaron en 19, 9 y 60 % (Tabla II).

TABLA II. EFECTO DE CARBARIL, PLOMO Y SUS MEZCLAS SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES ( $\mu\text{g}$ /mg de biomasa seca) DE *Ankistrodesmus falcatus*

TRATAMIENTOS ( $\mu\text{g/l}$ )		24 h	48 h	72 h
TESTIGOS	I	12.90 $\pm$ 0.2	14.2 $\pm$ 0.5	9.9 $\pm$ 0.4
	II	58.99 $\pm$ 1.1	80.3 $\pm$ 1.9	62.3 $\pm$ 1.7
Pb	17	12.50 $\pm$ 1.0	14.3 $\pm$ 0.9	19.2 $\pm$ 0.5
	34	9.88 $\pm$ 0.7	13.1 $\pm$ 0.5	17.0 $\pm$ 2.2
	68	15.50 $\pm$ 0.3	15.6 $\pm$ 0.1	15.9 $\pm$ 0.1
CARBARIL	25	42.50 $\pm$ 1.2	16.4 $\pm$ 1.2	25.1 $\pm$ 1.1
	50	28.80 $\pm$ 1.6	17.5 $\pm$ 0.6	15.9 $\pm$ 0.1
	75	67.60 $\pm$ 1.6	24.2 $\pm$ 0.8	59.3 $\pm$ 2.1
Pb-CA (17-25)		73.30 $\pm$ 1.5	43.4 $\pm$ 2.3	44.1 $\pm$ 1.6
Pb-CA (34-50)		61.90 $\pm$ 1.3	37.9 $\pm$ 1.8	36.4 $\pm$ 1.9

Cada valor representa la media de 5 experimentos  $\pm$  E.E.

En forma general se pudo observar que el CA, a los diferentes tiempos de exposición y concentraciones empleadas en este estudio, disminuyó los niveles de azúcares, a excepción de los lotes inoculados con 75 ppm durante 24 h, ya que

se presentó un incremento del 14 % de estas biomoléculas al compararlo con los lotes testigo II ( $p < 0.05$ ) (Tabla II).

En los lotes contaminados con las mezclas de 17-25 y 34-50 de Pb-CA durante 24 h, los azúcares aumentaron en 24 y 5 % ( $p < 0.01$ ), pero a tiempos mayores (48 y 72 h) en todas las concentraciones del insecticida, estas biomoléculas disminuyeron hasta 52 % ( $p < 0.01$ ) con respecto al lote testigo II (Tabla II).

### Efecto sobre la concentración de lípidos en la biomasa

Los lípidos en la biomasa de algas expuestas a diferentes tiempos y concentraciones de Pb mostraron una tendencia a disminuir, ya que en los lotes contaminados con 17, 34 y 68 ppm del metal durante 24 h los niveles decrecieron con respecto al testigo I en 36, 61 y 4 %; asimismo a las 48 h en las concentraciones de 34 y 68 ppm de Pb la concentración de estos compuestos biogénicos disminuyó 32 y 12 %; a las 72 h a 17 y 34 ppm de Pb el descenso fue de 18 y 26 %. Sin embargo, a la concentración de 17 ppm /48 h y 68 ppm/72 h se apreció un aumento de 9 y 5 %, respectivamente (Tabla III).

La concentración de lípidos en la biomasa de los lotes de *A. falcatus* con 25, 50 y 70 ppm de CA durante 24 h aumentaron en 23, 35 y 37 %, respectivamente; en los expuestos a estas mismas concentraciones durante 48 h se mostraron ascensos de 118, 236 y 203 % ( $p < 0.001$ ). A las 72 h únicamente los lotes con 25 ppm de CA se incrementaron en 34 % ( $p < 0.01$ ) con respecto al lote testigo II, pero en los lotes tratados con 50 y 70 ppm del insecticida al mismo tiempo de exposición, los lípidos disminuyeron en 19 y 23 %, respectivamente (Tabla III).

TABLA III. EFECTO DE CARBARIL, PLOMO Y SUS MEZCLAS SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE LÍPIDOS ( $\mu\text{g}$ /mg de biomasa seca) DE *Ankistrodesmus falcatus*

TRATAMIENTOS ( $\mu\text{g/l}$ )		24 h	48 h	72 h
TESTIGOS	I	0.0	0.17 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01
	II	0.08 $\pm$ 0.0	0.17 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01
Pb	17	0.0	1.35 $\pm$ 0.20	0.68 $\pm$ 0.05
	34	0.21 $\pm$ 0.02	1.84 $\pm$ 0.05	1.03 $\pm$ 0.06
	68	0.48 $\pm$ 0.03	1.04 $\pm$ 0.04	1.26 $\pm$ 0.08
CARBARIL	25	18.49 $\pm$ 0.50	4.89 $\pm$ 0.90	6.57 $\pm$ 0.90
	50	42.36 $\pm$ 6.10	14.50 $\pm$ 1.10	14.79 $\pm$ 0.70
	75	54.80 $\pm$ 6.60	33.55 $\pm$ 2.50	28.51 $\pm$ 1.50
Pb-CA (17-25)		8.98 $\pm$ 1.10	5.14 $\pm$ 0.29	2.72 $\pm$ 0.60
Pb-CA (34-50)		3.39 $\pm$ 0.70	14.41 $\pm$ 0.80	8.44 $\pm$ 0.30

Cada valor representa la media de 5 experimentos  $\pm$  E.E.

Los dos tipos de mezclas de contaminantes de Pb-CA empleadas en este estudio aumentaron la concentración de lípidos en la biomasa del alga a todos los tiempos estudiados, siendo

más significativo este efecto a las 48 h, ya que para las mezclas de 17-25 y la de 34-50 de Pb-CA el nivel de estas sustancias en el alga se incrementó en 215 y 203 %, respectivamente, comparándolo con el testigo II ( $p < 0.001$ ) (Tabla III).

### Efecto sobre la concentración de lípidos en el medio

En el lote testigo I/24 h no se detectaron lípidos en el medio, sin embargo, en los lotes contaminados con 34 y 68 ppm de Pb, se determinaron concentraciones significativas ( $p < 0.01$ ). A las 48 h en los lotes cultivados con 17, 34 y 68 ppm de metal, el aumento de estas biomoléculas fue de 7, 10 y 6 veces más que el testigo I. A las 72 h en los lotes expuestos a 17, 34 y 68 ppm de Pb los lípidos fueron 4, 7 y 8 veces más con respecto al mismo testigo (Tabla IV).

TABLA IV. EFECTO DE CARBARIL, PLOMO Y SUS MEZCLAS SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE LÍPIDOS EN EL MEDIO ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de biomasa seca) DE *Ankistrodesmus falcatus*

TRATAMIENTOS ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )		24 h	48 h	72 h
TESTIGOS	I	29.1 $\pm$ 1.1	44.1 $\pm$ 1.4	57.4 $\pm$ 1.3
	II	106.3 $\pm$ 6	29.1 $\pm$ 1.1	81.3 $\pm$ 2.3
Pb	17	18.4 $\pm$ 3.8	48.2 $\pm$ 1.1	46.7 $\pm$ 1.1
	34	11.0 $\pm$ 1.2	29.7 $\pm$ 1.4	42.1 $\pm$ 0.8
	68	27.7 $\pm$ 0.5	38.9 $\pm$ 2.8	60.7 $\pm$ 0.9
CARBARIL	25	131.8 $\pm$ 4	63.6 $\pm$ 1.1	109.5 $\pm$ 6.0
	50	144.5 $\pm$ 1	97.9 $\pm$ 3.8	65.5 $\pm$ 0.7
	75	146.3 $\pm$ 8	88.3 $\pm$ 1.3	62.2 $\pm$ 0.8
Pb-CA (17-25)		133.5 $\pm$ 1	91.8 $\pm$ 1.8	91.6 $\pm$ 2.8
Pb-CA (34-50)		142.5 $\pm$ 3	88.3 $\pm$ 5.1	94.2 $\pm$ 4.0

Cada valor representa la media de 5 experimentos  $\pm$  E.E.

En los lotes expuestos a 25, 50 y 75 ppm del insecticida durante 24 h, los lípidos en el medio fueron 216, 481 y 622 veces más que el testigo II. En los lotes tratados con estas mismas concentraciones pero a los tiempos de 48 h, los incrementos fueron de 28, 134 y 190 veces con relación al testigo II. A las 72 h, estas sustancias aumentaron 59, 133 y 256 veces con respecto a su testigo (Tabla IV).

La concentración de lípidos en el medio de las microalgas expuestas a la mezcla de 17-25 de Pb-CA a los tiempos de 24, 48 y 72 h aumentaron 102, 29 y 24 veces al compararlos con el testigo II; en la mezcla de 34-50 ppm de Pb-CA a los mismos tiempos, los incrementos fueron de 38, 81 y 76 veces más que el testigo II (Tabla IV).

Las concentraciones de clorofila, azúcares reductores y lípidos en la biomasa en los lotes testigo I (únicamente el inóculo patrón del alga con el medio Kessler) no mostraron cambios significativos con respecto al tiempo; sin embargo, al compararlos con los testigos II (lotes que contenían el disolvente del carbaril, acetona) se evidenció un aumento sig-

nificativo en estos parámetros casi a todos los tiempos de exposición evaluados en este estudio ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

Para iniciar la discusión sobre los efectos tóxicos del insecticida y del metal, así como de sus mezclas sobre los parámetros bioquímicos mencionados en *Ankistrodesmus falcatus*, es necesario explicar el comportamiento de los lotes testigo I y II. La curva de crecimiento de la microalga del cultivo patrón, *A. falcatus* alcanza la fase estacionaria a los 13 días en el medio Kessler en condiciones de temperatura (21° C), iluminación (1900 luxes) y aireación constante. La máxima concentración de clorofila en esta microalga se obtiene a las 168 h de incubación en medio Kessler (Martínez-Jeronimo y Chávez-Espinoza 1994). En este estudio se observó que el contenido del pigmento en el testigo I no cambió en forma significativa a las 24, 48 y 72 h, pero sí se produce una cantidad suficiente que permite evaluar el efecto de los xenobióticos sobre su síntesis (Tabla I).

Con lo que respecta al testigo II se puede considerar en términos generales que la acetona, vehículo con el cual se disolvió el CA, incrementó la concentración de clorofila, azúcares reductores y lípidos de la biomasa y medio algal. Este aumento puede explicarse con base en la posibilidad de que la acetona modifique el potencial del citocromo b y bajo estas condiciones estimule al fotosistema II (FS-II) (Stewart 1974), lo cual podría repercutir en el crecimiento algal y por consiguiente en los parámetros bioquímicos evaluados en el presente estudio. Es importante hacer mención que a pesar de que este disolvente aumentó en algunos casos los niveles de los indicadores del daño, éste no fue significativo y no enmascaró el efecto de los xenobióticos en estudio. Esta comparación es válida, ya que es común utilizar la acetona como disolvente de contaminantes, principalmente para los que son insolubles en el agua como organoclorados, organofosforados, petróleo, etc. (Wochok y Welch 1976, Kumar *et al.* 1991, Martínez-Tabche *et al.* 1994).

La primera etapa de la fotosíntesis es la absorción de la luz por la clorofila, una porfirina con un ión  $\text{Mg}^{++}$  coordinado. Azeez y Bonerjee (1987), informan que el Pb actúa sobre la clorofila, desplazando al  $\text{Mg}^{++}$  y cambiando consecuentemente las propiedades fisicoquímicas de dicho pigmento, ya que al estar ausente este metal, impide que se forme la protoporfirina IX y por consiguiente la protoclorofila. En este trabajo se observó que el Pb después de las 72 h de exposición disminuyó la concentración de clorofila, ya que a las 24 y 48 h hubo un comportamiento similar al T-I, excepto en el lote expuesto a 34 ppm/24 h. Es probable que el metal a este tiempo de exposición penetre al cloroplasto de la microalga y sustituya al  $\text{Mg}^{++}$ , lo cual inhibe el proceso fotosintético de *A. falcatus*.

En la microalga expuesta a diferentes niveles de Pb se disminuyó, de manera importante, la concentración de lípidos en la biomasa del alga; es probable que este metal pueda ac-

tuar sobre la  $\beta$ -carboxilación (Rai *et al.* 1981) impidiendo que se produzca acetil-CoA, sustancia donadora de carbono para la síntesis de ácidos grasos.

Los herbicidas carbamatos de N-fenilo, como es el CA, afectan la fotosíntesis, por inhibición de la reacción de Hill o del transporte de electrones fotosintéticos; pero en la mayoría de los casos, el efecto no parece ser muy marcado (Cremlyn 1986). En este estudio se encontró que el insecticida aumentó la concentración de clorofila en lotes de *A. falcatus* a las 24 h, es probable que este efecto se deba a que el amoniaco, producto de degradación del CA (Matsumara 1982), pueda ser utilizado para producir más glicina (Bidwell 1993), aminoácido que se combina con la acetil-CoA para formar el ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -cetoadípico, que al descarboxilarse se convierte en el ácido  $\delta$ -aminolevulínico, precursor del grupo pirrol, que es constituyente del grupo hemo de las clorofilas.

Con el aumento en la concentración de los lípidos totales, no se puede afirmar que este plaguicida sea inocuo para *A. falcatus*, ya que el incremento de estas biomoléculas demuestra que existe un desajuste de su metabolismo, además, aunado a la disminución en la producción de los azúcares reductores al estar expuesta a diferentes tiempos y concentraciones de CA, sugiere también que la utilización y manejo de los carbohidratos no es la adecuada.

El efecto de 75 ppm de CA sobre la microalga observado a las 72 h, fue la disminución en la concentración de clorofila, azúcares reductores y lípidos en la biomasa. En este caso es probable que el CA esté actuando como algicida, lo cual concuerda con lo informado por Rojas (1984), quien señala que este insecticida a elevadas concentraciones daña la división celular e induce la poliploidía llegando a inhibir el crecimiento, así como la fotosíntesis de diferentes vegetales.

En forma general la exposición al CA provocó aumento en la concentración de lípidos en el paquete celular y en el medio de Kessler, así como disminución de azúcares reductores y clorofila, probablemente porque este plaguicida al estimular la glicólisis (Pant y Tejendra 1983), aumenta la síntesis de ácidos grasos. Este efecto también puede afectar el proceso de fotosíntesis, probablemente porque parte de los productos finales de la glicólisis no son utilizados para la formación de productos intermediarios fotosintéticos, sino que se desvían hacia la producción de piruvato.

En lo que respecta al efecto de las mezclas de CA-Pb sobre la microalga, se observó una acción tóxica de potenciación muy marcada, probablemente el daño se deba principalmente al CA, ya que los lotes que se contaminaron únicamente con el insecticida mostraron comportamiento similar. En el presente estudio se sugiere que el Pb al producir labilidad de las membranas (Martínez-Tabche *et al.* 1990), cambia su permeabilidad permitiendo que entre con mayor facilidad el CA, lo que daría como resultado que la síntesis de azúcares, clorofila y lípidos se afecte en forma significativa, pero para comprobar esta hipótesis será nece-

sario realizar más estudios.

Por los resultados obtenidos se puede concluir que el efecto tóxico producido por la mezcla de contaminantes en altas concentraciones en *Ankistrodesmus falcatus* fue mayor que cuando el alga se expuso a los xenobióticos aisladamente, este hecho sugiere reconsiderar la existencia de un efecto sinérgico significativo entre los mismos para establecer los límites permitidos de estos contaminantes.

## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de investigación fue financiado por CONACyT (3458-N) y DEPI/IPN (933104).

## REFERENCIAS

- Aly D.M. y El-Dib M.A. (1971). Studies on the persistence of some carbamate insecticides in the aquatic environment. I. Hydrolysis of sevin, baygon, pyrolan and dimetilan in water. *Water Res.* 5, 1191-1205
- Ariens E. J., Lehmann P.A. y Simoins A.M. (1978). *Introducción a la toxicología general*. Diana, México, pp. 61-165.
- Atwoot H. (1982). *The biology of crustacea zoology and physiology*, Academic Press, Ontario, pp. 105-150.
- Azeez P.A. y Bonerjee D.K. (1987). Influence of light on chlorophyll a content of blue-green algal treated with heavy metals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 1062-1069.
- Bazzoz M.B. y Govindjee J.L. (1974). Effects of lead chloride on chloroplast reactions. *Environ. Lett.* 6, 175-191.
- Bidwell R.G.S. (1994). *Fisiología vegetal*. AGT Editor, México, pp. 129-134.
- Burden S.R., Cooke D.T. y Hargreaves J.A. (1990). Review mechanisms of action of herbicidal and fungicidal compounds on cell membranes. *Pestic. Sci.* 30, 125-140.
- Cremlyn R. (1986). *Plaguicidas modernos y su acción bioquímica*. Limusa, México, pp. 235-235.
- Diario Oficial de la Federación, Catálogo Oficial de Plaguicidas de 1991, Tomo CDLV No 13, México D.F., Lunes 19 de Agosto de 1991, pp. 38, 1a. sección.
- González V., Ayala J.H. y Alfonso A.M. (1992). Degradation of carbaryl in natural waters: enhanced hydrolysis rate in micellar solution. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 171-178.
- Hill I.R., Mathieseen P. y Heimbach F. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. En: *Workshop on sediment toxicity assessment*. Slot Moermond Congrescentrum Renesse Holanda, 8-10 Noviembre.
- Koepe D.E. y Miller R.J. (1970). Lead effects on corn mitochondrial respiration. *Science* 167, 1376-1377.
- Kuhr R.J. y Dorough H.W. (1976). *Carbamate insecticides chemistry, biochemistry and toxicology*. CRC Press, Cleveland, pp. 37-45.

- Kumar B.A., Kumar B.N., Dilip R., Aparna C. y Kumar B.S. (1991). Growth chlorophyll content, nitrogen fixing ability and certain metabolic activities of *Nostoc muscarum*. Effect of methylparathion and benthocarb. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 47, 43-49.
- Lewis M.A. (1991). Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. Water Res. 25, 101-113.
- Liasen-Jessen B.R. y Jessen A.A. (1971). Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues. *Methods of enzymology* (C.P. Colowick y N.O. Kaplan, Eds.), Academic Press, Londres, pp. 668-677.
- Marking L.L. (1984). Toxicity of chemicals. En: *Fundamentals of aquatic toxicology methods and applications*. Rand Hemisphere, Nueva York, pp. 164-176.
- Martínez-Jerónimo F. y Espinoza-Chávez F. (1994). A laboratory-scale system for mass culture of freshwater microalgae in polyethylene bags. J. Appl. Phycol. 6, 423-425.
- Martínez-Tabche L., Martínez C.M. y Sánchez-Hidalgo E. (1990). Comparative study of toxic lead effect on gill and haemoglobin of tilapia fish. J. Appl. Toxicol. 10, 193-195.
- Martínez-Tabche L., Galar M.M., Ramírez M. B., German F.C. y Galar C.I. (1992). Toxic effect of paraquat on the alga *Ankistrodesmus falcatus*. Int. J. Toxicol. Occup. Environ. Health 1, 70-73.
- Martínez-Tabche L., Galar M.M., Ramírez M.B., Morales R.A. y German F.C. (1994). Parathion effect on acetylcholinesterase from fish through an artificial trophic chain: *Ankistrodesmus falcatus*-*Moina macrocopia*-*Oreochromis hornorum*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 52, 360-366.
- Matsumara E. y Krishna C.R. (1982). *Biodegradation of pesticides*. Plenum Press, Nueva York, pp. 117-135.
- Munawar M., Munawar I.F. y Mayfield C.I. (1987). Differential sensitivity of natural phytoplankton size assemblage to metal mixture toxicity. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 25, 123-139.
- Muralekrishna P. G. y Venkateswarhi K. (1981). Effect of insecticides on algal population in vegetable soil. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 133, 241-245.
- Ortiz-Hernández M. L., Gutiérrez-Ruiz M.E. y Sánchez-Salinas E. (1994). Caracterización y propuesta de manejo de los lodos residuales de la planta de tratamiento de CIVAC, Estado de Morelos. Rev. Int. Contam. Ambient. 10, 128-130.
- Pant J.C. y Tejendra S. (1983). Induced of metabolic dysfunction by carbamate and organophosphorus compounds in fish *Puntius conchoniis*. Pest. Biochem. Physiol. 20, 294-298.
- Pérez Z.A.J. y Deleón R.I. (1993). La contaminación por plomo en Coatzacoalcos: un ejemplo de deterioro ambiental. Instituto Politécnico Nacional, México, pp. 3-24.
- Postma T. y Stroes J.A. (1968). Lipid screening in clinical chemistry. Biochem. Soc. Transact. 22, 569-578.
- Rai L.C., Gaur J.P. y Kumar H.D. (1981). Phycology and heavy metal pollution. Biol. Rev. 56, 99-151.
- Rand G.M. y Petrocelli S.R. (1984). *Fundamentals of aquatic toxicology methods and applications*. Rand Hemisphere, Nueva York, pp. 4-7.
- Rojas G.M. (1984). *Manual teórico práctico de herbicidas y fitorreguladores*. Noriega Editores, México, pp. 59-61
- Saroja S.G. y Bose S. (1984). Recovery from methyl parathion induced damage of the photosynthetic apparatus in *Chlorella prothecoides*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 32, 102-108.
- Shehan P. J. (1984). Effects on individuals and populations En: *Effects of pollutants at the ecosystem level*. Wiley, Nueva York, pp. 25-31.
- Siebe C. (1994). Acumulación y disponibilidad de metales pesados en suelos regados con aguas residuales en el distrito de riego 03, Tula, Hidalgo, México. Rev. Int. Contam. Ambient. 10, 15-21.
- Stewart W.D.P. (1974). *Algal phycology and biochemistry*. Blackwell, Londres, pp. 1-39.
- Whitton B.A. (1984). Algal as monitors of heavy metals in freshwater. En: *Algae as ecological indicators*. Academic Press, Londres, pp. 257-273.
- Wochok Z.S. y Welch T. (1976). Carbaryl effects on growth and development in suspension cultures of wild carrot. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 16, 325-329.
- Yemm E.W. y Willis A.J. (1954). The estimation of the carbohydrates in plant extracts by antrone. Biochem. J. 57, 508-514.