



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

EFFECTOS DEL ACEITE AUTOMOTRIZ SOBRE PARÁMETROS
POBLACIONALES, CONTENIDO DE PIGMENTOS Y COMPOSICIÓN
BIOQUÍMICA DE LA MICROALGA *Tetraselmis sp.* (G1)
DEL NORORIENTE DE VENEZUELA

(Modalidad: Tesis de Grado)

ANA VERÓNICA BLANCO BRUZUAL

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CUMANÁ, MAYO 2011

EFFECTOS DEL ACEITE AUTOMOTRIZ SOBRE PARÁMETROS
POBLACIONALES, CONTENIDO DE PIGMENTOS Y COMPOSICIÓN
BIOQUÍMICA DE LA MICROALGA *Tetraselmis* sp. (G1)
DEL NORORIENTE DE VENEZUELA

APROBADO POR:

Prof. César Lodeiros

Asesor

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	6
Microalgas y condiciones de cultivo.....	6
Concentración inhibitoria media (CI50)	6
Bioensayos	7
Recuento celular.....	8
Tasa de crecimiento.....	8
Concentración de clorofila <i>a</i> y carotenoides totales	9
Proteínas totales	9
Carbohidratos totales.....	10
Lípidos totales	11
Equivalentes energéticos de los carbohidratos, lípidos y proteínas	12
Análisis Estadísticos	13
RESULTADOS.....	14
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	27
RECOMENDACIONES.....	28
BIBLIOGRAFÍA	30
APÉNDICES.....	39
HOJA DE METADATOS	¡Error! Marcador no definido.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Cesar Lodeiros por su valiosa asesoría y dedicación en la realización de esta tesis.

A la Lcda. Roraysi Cortez quien me enseñó y me inició en el mundo de las microalgas.

Al profesor Miguel Guevara por toda su ayuda y conocimientos prestados.

Al Lic. Leandro Bastardo por toda su colaboración en la parte experimental y apoyo en la elaboración de este trabajo.

A mis padres y mis hermanos por ayudarme a culminar esta meta.

A toda mi familia, abuelos, tíos y primos, en especial a mi abuela Elvira por todo su apoyo y cariño.

A la Licda. Lailyn Márquez por todos sus consejos y apoyo.

A mis grandes amigas que han estado en todo momento a mi lado, la Ing. Fanny Sánchez y la Lcda. Francis Morales, se les quiere...

A mi amiga Dulce Semidey a quien agradezco toda su ayuda en la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Acuicultura, de quienes recibí los mejores consejos y aportes para la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A DIOS por bendecirme para alcanzar esta meta.

A mis padres Hugo Blanco y Norelys Bruzual de Blanco, quienes con su amor incondicional y apoyo me guiaron en la culminación de este sueño profesional como todo en mi vida...

Al ser más importante, mi hijo José Gregorio, eres mi fortaleza!!! Te amo.

A mis hermanos Mary y Samuel; han sido en muchas ocasiones mis ejemplos a seguir..

A mis sobrinas María Sofía y Miranda, me sirvieron de inspiración para cumplir este objetivo.

Han sido pilares en mi vida y hoy forman parte de este logro en mi desarrollo profesional.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentración inhibitoria media (CI ₅₀) para la microalga <i>Tetraselmis</i> sp. a las 96 h de exposición a las fracciones acuosas del aceite automotriz (No usado y usado).....	14
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura1. Efecto de la fracción acuosa del aceite automotriz no usado y usado sobre el crecimiento de la microalga autóctona <i>Tetraselmis</i> sp. (G1).....	15
Figura 2. Efecto de la fracción acuosa del aceite automotriz no usado y usado sobre el contenido de clorofila a (a) y carotenoides totales (b) de la microalga autóctona <i>Tetraselmis</i> sp. (G1).....	17
Figura 3. Efecto de la fracción acuosa del aceite automotriz no usado y usado sobre el contenido de proteínas (a), contenido de carbohidratos (b), lípidos totales (c) y la energía (d) de la microalga autóctona <i>Tetraselmis</i> sp. (G1).	19

RESUMEN

La microalga *Tetraselmis* sp., autóctona del nororiente de Venezuela, fue cultivada en condiciones de laboratorio y expuesta a diferentes concentraciones de una fracción acuosa de aceite automotriz usado y no usado (0, 50, 60, 70 y 80%). Se evaluó el efecto de este contaminante sobre el crecimiento, contenido de pigmentos (clorofila a y carotenoides totales) y composición bioquímica (proteínas, carbohidratos y lípidos) de la microalga a las 0, 48 y 96 h. Las concentraciones de las fracciones acuosas de los aceites fueron escogidas según los resultados arrojados por la prueba preliminar CI50 (concentración inhibitoria media) de cada aceite (usado = 59,72% y no usado = 54,79%). Los parámetros evaluados presentaron una tendencia similar de respuesta ante los dos aceites. El porcentaje de crecimiento de la microalga fue afectado negativamente a medida que se aumenta la concentración de los aceites a las 48 y las 96 h del experimento. Se obtuvieron mayores valores de crecimiento en el tratamiento 0% para ambos aceites (no usado: $330,54 \pm 22,497\%$; usado: $299,04 \pm 29,874\%$) y los valores menores al 80% para ambos aceites (aceite no usado $81,79 \pm 11,424\%$ y aceite usado $75,43 \pm 12,322\%$) a las 96 h. Los pigmentos de la microalga mostraron un patrón de disminución en proporción a la concentración del contaminante sólo a las 96 h. Se encontró mayor contenido de clorofila a al 0% de concentración a las 96 h (aceite no usado: $1,326 \pm 0,08$ pg cel-1 y aceite usado $1,24 \pm 0,176$ pg cel-1) y el menor contenido de este pigmento en el tratamiento 80% (aceite no usado: $0,35 \pm 0,039$ pg cel-1 y aceite usado $0,41 \pm 0,070$ pg cel-1). Los carotenoides totales de la microalga presentaron su mayor concentración a las 96 h en el tratamiento sin tóxico (0%) con valores de $0,703 \pm 0,095$ pg cel-1 para el aceite no usado y $0,588 \pm 0,069$ pg cel-1 para el aceite usado y su menor concentración al 80% de exposición a las 96 h. La microalga presentó una disminución de proteínas y carbohidratos a medida que aumenta la concentración de los aceites siendo más evidente este efecto a las 48 y 96 h de exposición. Se registraron los mayores valores de proteínas y carbohidratos al 0% de concentración (no usado: $94,17 \pm 7,184$ y $16,76 \pm 2,215$ pg cel-1; usado: $93,96 \pm 10,900$ y $18,62 \pm 2,85$ pg cel-1, respectivamente) y los valores menores al 80% (no usado: $31,24 \pm 3,951$ y $6,96 \pm 1,313$ pg cel-1; usado: $37,24 \pm 6,541$ y $7,87 \pm 0,431$ pg cel-1, respectivamente) a las 96 h. En cuanto a los lípidos se presentó un patrón contrario a los dos componentes bioquímicos anteriores resultando un incremento de este parámetro en proporción a la concentración del tóxico siendo los valores máximos al 80% (aceite no usado: $78,51 \pm 16,640$ pg cel-1; aceite usado: $80,09 \pm 13,683$ pg cel-1) a las 96 h del bioensayo. De manera general los resultados mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los factores analizados (aceite, concentración y tiempo) en todos los tiempo de exposición.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento exponencial de la población, así como de industrias y automóviles, convierten a las ciudades en el principal centro emisor de contaminantes, siendo los océanos y mares el depósito final de gran parte de las sustancias desechadas por el hombre (Livingstone, 2001; Correia *et al.*, 2003).

A causa de la complejidad del ambiente marino es difícil establecer el grado de deterioro que afecta a las especies o comunidades acuáticas. Por esta razón es conveniente realizar bioensayos utilizando organismos vivos en condiciones controladas de laboratorio (Villamar, 1996). Los efectos adversos de estas sustancias en los organismos incluyen efectos letales a corto o largo plazo y efectos subletales como alteraciones en la alimentación, el crecimiento, la reproducción, y otros estados fisiológicos (Sousa, 2002).

En la década de los 40 del siglo pasado se iniciaron estudios sobre los efectos de sustancias químicas y de residuos sobre el medio ambiente (Anderson, 1944), así también, posteriormente se realizaron pruebas agudas con peces (Hunn, 1989). Poco tiempo antes de la segunda guerra mundial, se realizaron experimentos relacionados con la acción de sustancias y metales en cladóceros y peces utilizados en investigaciones de contaminación de agua, en campo y en laboratorio, conforme reportan Anderson (1944, 1980) y Hunn (1989). La década de los 90 fue la que marcó un crecimiento continuo en el campo de la ecotoxicología; avanzando en la utilización de biomarcadores, escogencia de sistemas de pruebas alternativos, como por ejemplo Microtox (Goldberg y Frazier, 1989; Blaise, 1991), en pruebas de toxicidad en microescala (Wells *et al.*, 1998), automatización de varias técnicas para la validación de toxicidad aguda, medidas de genotoxicidad y contribuciones para el

desenvolvimiento conceptual de toxicología acuática en el laboratorio y en el campo (Munkittrick y Dixon, 1989; Nipper *et al.*, 1990; Bartell *et al.*, 1992; Burton, 1992; Carr y Chapman, 1992; McCarty y Mackay, 1993; Suter II, 1993).

Los estudios del efecto de hidrocarburos sobre organismos fotosintetizadores han sido relativamente escasos. Gaur y Kumar (1981) mostraron que la tasa de crecimiento de *Anacystis nidulans* fue estimulada a bajas concentraciones (5 – 10 µl de aceite/ 10 ml de cultivo) de crudo *Assam* y crudo de los Emiratos Árabes Unidos y fue inhibida a altas concentraciones de éstos y del crudo *Bombay*. También observaron la inhibición del crecimiento de las microalgas *Oocystis* sp, *Chlorella vulgaris* y *Selenastrum capricornutum* por todos estos crudos. Fábregas *et al.* (1984) observaron que bajas concentraciones de hidrocarburos estimularon el crecimiento y la producción de clorofila *a* de *Tetraselmis suecica*; mientras que altas concentraciones (200 ppm) inhibieron su crecimiento. Briceño (2004) observó que la fracción soluble del petróleo no influenció la composición bioquímica de dos cianobacterias, sin embargo, el querosen disminuyó el contenido de carbohidratos en dichos organismos.

El petróleo y los productos de su refinación corresponden a una mezcla de hidrocarburos y otros compuestos que poseen amplias diferencias en sus propiedades físicas y químicas; las cuales determinan su comportamiento y destino cuando son derramados y el impacto de éstos sobre los recursos biológicos, la fauna y flora marina (O`Sullivan y Jacques, 2001). Entre los componentes más dañinos del petróleo y sus derivados están los hidrocarburos aromáticos, ya que algunos actúan como venenos agudos, presentando en algunos casos actividad carcinogénica. Cabe destacar que los hidrocarburos de bajo peso molecular pueden estimular o inhibir el crecimiento del fitoplancton dependiendo de la especie (Botello, 1978).

Los aceites lubricantes son hechos por un proceso de destilación bajo vacío de una fracción del petróleo crudo, componentes aromáticos inestables y componentes que son removidos por extracción del solvente para producir una variedad de bases de aceites lubricantes (Nuñez, 2001). Los aceites usados de motores de vehículo están considerados como una mezcla de sustancias potencialmente tóxicas por estar constituidos principalmente por una variedad de compuestos químicos, tales como fenoles, metales pesados, solventes clorados, metales orgánicos complejos y una variedad de compuestos heteroatómicos polares, (Korte y Bedefed, 1978; Hellou *et al.*, 1997; Ngabe *et al.*, 2000), además de hidrocarburos policíclicos aromáticos que pueden acumularse en el aceite en uso debido posiblemente a una combustión incompleta, o al mezclarse con la gasolina o combustible del motor del automóvil (Pruell y Quinn, 1988).

La biodisponibilidad de estos contaminantes puede estar asociada a su distribución en el sedimento, partículas suspendidas, columna de agua y la cadena trófica; siendo la vía de contaminación determinada en gran parte por el hábito alimentario y condición de vida en el nicho ecológico (Lemaire y Livingstone, 1997; Livingstone, 2001).

El fitoplancton constituye el primer eslabón de la cadena trófica en los ecosistemas acuáticos (Nyholm y Källqvist 1989); es por ello que al alterarse la composición de la comunidad de microalgas, como resultado de estrés toxicológico, se modifica la estructura y la función de todo el sistema (Prósperi, 2000). En estos ambientes las microalgas son los principales productores de materia orgánica necesaria en la alimentación y supervivencia de todos los demás organismos acuáticos (Aidar *et al.*, 2002). Es importante, por lo tanto, conocer los posibles efectos de contaminantes y agentes químicos sobre las poblaciones algales a partir de datos obtenidos en pruebas de toxicidad utilizando especies sensibles (Walsh, 1988).

Algunas microalgas son consideradas organismos potencialmente bioindicadores y son excelentes sujetos de estudio para este tipo de experimentos, puesto que presentan sensibilidad ante diversos materiales de prueba, sus requerimientos nutricionales son conocidos, poseen una alta tasa de crecimiento que permite conocer en pocos días el efecto causado por el agente tóxico y su manipulación es relativamente sencilla en el laboratorio (Liu y Dutka, 1984).

Recientemente, Cortez *et al.* (2007) evaluó la influencia del petróleo crudo en el crecimiento, pigmentos y composición bioquímica de microalgas del nororiente de Venezuela (*Tetraselmis* sp. G1, *Chaetoceros* sp. A1 y *Dunaliella salina*), mostrando una sensibilidad en estas microalgas que las caracteriza como adecuadas para análisis ecotoxicológicos de corta duración.

Las microalgas prasinofitas del género *Tetraselmis* sp. son de gran utilidad en la acuicultura, son de excelente valor alimenticio para las larvas, juveniles y adultos de ostras (Helm, 1977). Estas microalgas se caracterizan por presentar cuatro flagelos, que salen de una hendidura en uno de los extremos de la célula. Las células están cubiertas por escamas orgánicas que suelen desprenderse. Presentan un solo cloroplasto y son de color verde (Madigan *et al.*, 1999). Su amplia distribución en ecosistemas tropicales y su extensa utilización en cultivos de laboratorio, les confiere una importancia notable como posibles especies modelo para estimar el impacto ambiental producido por contaminantes (Cordero *et al.*, 2005).

Según datos oficiales (ATSDR, 1997), anualmente se consumen 45 millones de toneladas de aceites lubricantes en todo el mundo y del aceite generado por los motores de automóviles se estima que 1 l contamina 1 000 m³ de agua, lo cual constituye el consumo anual de 50 personas (en el área rural y con limitaciones de disponibilidad de agua) y puede cubrir en una extensión terrestre 32 376 m² de agua superficial, alterando el equilibrio ecológico. Estas estimaciones a nivel terrestre se

potencian cuando se piensa que el mar es el receptáculo final de todos estos contaminantes; sin duda alguna, el uso indiscriminado de carburantes y aceites, sin un control de sus desechos, pueden generar efectos negativos en la flora y fauna marina.

En Venezuela, los aceites utilizados por los automóviles, como una observación personal y generalizada, no son almacenados y depositados en contenedores adecuados para ser resguardados. Por ejemplo, en la ciudad de Cumaná, según los funcionarios de la Alcaldía de Sucre, no existe ningún reglamento y control u ordenanza municipal que establezca normas para el tratamiento de este tipo de desechos, salvo en tipos de empresas como el concesionario de automóviles MOYTOCA C.A. que por normativas de la marca comercial TOYOTA de Venezuela, estos desechos son almacenados y posteriormente recolectados por una empresa (CADIPRONA) que se encarga de su tratamiento. A pesar de las medidas tomadas por compañías como la anteriormente mencionada, en la mayoría de los casos los desechos como el aceite automotriz usado se encuentran expuestos a ser transportados por las escorrentías que se producen por las precipitaciones de lluvia en la ciudad, llegando al lecho marino por los canales de desagüe.

En la presente investigación se planteó evaluar el efecto de la fracción acuosa del aceite automotriz (usado y no usado) a nivel del primer eslabón de la cadena trófica, utilizando la microalga *Tetraselmis* sp. proveniente de aguas costeras del nororiente de Venezuela.

METODOLOGÍA

Microalgas y condiciones de cultivo

La microalga que se utilizó corresponde a una cepa autóctona del nororiente de Venezuela (*Tetraselmis* sp. G1). Esta especie pertenece al cepario de microalgas del Laboratorio de Acuicultura del Instituto Oceanográfico de Venezuela de la Universidad de Oriente (IOV- UDO), siendo utilizada como alimento en el cultivo de invertebrados marinos (Marín *et al.*, 1994; Nuñez, 2000), y fue escogida como cepa modelo para ensayos de toxicidad debido a sus características, sensibilidad y facilidad de cuantificar el efecto del xenobiótico.

Para la realización de los experimentos, la microalga fue aclimatada y cultivada en el medio Algal con una concentración de $8 \mu\text{mol l}^{-1}$ de nitrato (Fabregas *et al.*, 1986) bajo condiciones controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), iluminación (2 000 lux, fotoperíodo 12:12) y salinidad (37 PSU).

Concentración inhibitoria media (CI50)

Con el fin de conocer las concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (usado y no usado) a utilizar en el experimento se realizó un bioensayo preliminar (este procedimiento se explica con más detalle más adelante en Bioensayos) de acuerdo con las recomendaciones hechas por Nascimento *et al.* (2002), se tomó muestras al inicio (0 h) y a las 96 h del cultivo para determinar el crecimiento de la microalga. Los datos obtenidos de esta prueba se utilizaron para calcular $CI_{50-96 \text{ h}}$ según Esclapés, (1999) con intervalos de confianza al 95%.

Bioensayos

Los cultivos de la microalga se realizaron por triplicado, de forma discontinua, utilizando envases de vidrio de 2 l de capacidad contentivo de 1,5 l de agua de mar (37 PSU) filtrada (papel Whatman GF/C 0,45 μm), esterilizada en autoclave y fertilizada con medio Algal. Los cultivos se agitaron manualmente dos veces al día. Cuando estos cultivos alcanzaron la fase de crecimiento exponencial (con una densidad de 32 125 cel ml^{-1}) se procedió a extraer de cada uno diferentes volúmenes, para exponerlos durante 96 h, a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite de motor para automóviles usado y no usado de una marca comercial específica, caracterizada como una de la más utilizadas en Venezuela. Las fracciones acuosas se obtuvieron mediante la combinación de 10 ml de los aceites con 90 ml de agua de mar filtrada y esterilizada, siguiendo las recomendaciones de Nascimento *et al.* (2002). La mezcla se mantuvo en agitación constante durante 24 h a 25°C; posteriormente, se colocó en un embudo de separación para obtener así la fracción acuosa, la cual se consideró como 100%. A partir de esta fracción, se preparó con agua mar filtrada y esterilizada el resto de las concentraciones (50, 60, 70, 80%) que se eligieron según los resultados de la prueba CI_{50-96} h para cada aceite.

Para la evaluación del efecto de las diferentes concentraciones de la fracción hidrosoluble del aceite sobre los cultivos de la microalga, a las 0, 48 y 96 h del período del bioensayo, se tomaron 0,5 ml de cada réplica de microalga, para realizar medidas de recuento celular. De igual manera se tomaron muestras de 5 ml de cada réplica a las 0, 48 y 96 h para determinar la concentración de clorofila *a*, carotenoides totales, proteínas, carbohidratos y lípidos, cuya metodología se describe a continuación:

Recuento celular

El recuento celular se realizó en muestras fijadas con lugol al 1%, con la ayuda de una cámara de Neubauer (hematocitómetro) de 0,1 mm de profundidad y un microscopio binocular Leica, modelo DM 1000, no contabilizando las células sin pigmentación por considerarse muertas. Para calcular la densidad celular, se utilizó la siguiente relación:

$$D=C \times 10^4 \times Fd, \text{ donde:}$$

D= Número de cel ml⁻¹

C= Promedio de células contadas en cuatro cuadrantes de la cámara.

Fd = Factor de dilución

Tasa de crecimiento

Con los valores del recuento celular, se calculó la tasa de crecimiento K tomando en cuenta el valor inicial y final de la exposición al aceite automotriz siguiendo las recomendaciones hechas por Madigan *et al.* (1999), utilizando la siguiente relación:

$$K = \frac{\log_{10}(X_f) - \log_{10}(X_0)}{0,301(t_f - t_0)}, \text{ donde:}$$

K= Tasa instantánea de crecimiento (div día⁻¹)

t_f-t₀ = Tiempo final e inicial de cultivo

X_f, X₀= Densidad celular final e inicial

Concentración de clorofila *a* y carotenoides totales

La determinación del contenido de clorofila *a* y carotenoides totales se realizó mediante el método de espectrofotometría. Para ello se filtraron 5 ml, por triplicado, de cada cultivo, empleando filtros Whatman GFF y un sistema de filtración al vacío Millipore. Los filtros, con las microalgas retenidas, se colocaron en tubos de ensayo y se les adicionó 5 ml de una mezcla acetona:metanol (2:1); posteriormente, se colocaron en un refrigerador durante 24 h para asegurar la extracción de los pigmentos. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron durante 15 min a 5 000 rpm en una centrífuga marca Dynac. A continuación, se determinó la absorbancia a las longitudes de onda 480, 647 y 664 nm, empleando un espectrofotómetro Jenway. La concentración de clorofila *a* se determinó de acuerdo a la ecuación de Jeffrey y Humphrey (1975):

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 11,93 (A_{664}) - 1,93 (A_{647})$$

Los carotenoides totales se determinaron mediante la ecuación propuesta por Strickland y Parsons (1972):

$$\text{Carotenoides Totales} = 4 (A_{480})$$

Para el análisis de la concentración de las restantes macromoléculas, las muestras (5 ml) se centrifugaron durante 15 min a 5 000 rpm. El precipitado resultante se mantuvo a una temperatura de -10°C hasta el momento de los análisis bioquímicos.

Proteínas totales

Las proteínas totales se determinaron según el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) modificado por Herbert *et al.* (1971). Para estos análisis, el precipitado de

microalgas se hidrolizó con 2 ml de NaOH 1 mol l⁻¹ durante 60 min a una temperatura de 95 a 100°C, luego las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente, clarificándose por centrifugación a 3 000 rpm durante 15 min. Luego, se transfirió, por triplicado, un volumen de 0,2 ml del sobrenadante a un tubo de ensayo, en el que se le adicionó 0,3 ml de agua destilada. Para la cuantificación de las proteínas, se usó como estándar una solución de seroalbúmina bovina (BSA) de 1 mg ml⁻¹, a partir del cual se obtuvo la curva patrón. Los valores de absorbancia de BSA para la elaboración de la curva patrón (que se hizo mediante un ajuste lineal por mínimos cuadrados). Tanto a la curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA) como al blanco y las muestras de las microalgas hidrolizadas, se les adicionó 0,4 ml de NaOH 1 mol l⁻¹ y 2ml de NaCO₃ al 5% m V⁻¹, al cual previamente se le adicionó una solución de CuSO₄.5H₂O al 0,5% m V⁻¹ en tartrato de potasio al 1% m V⁻¹ en una relación 50:2 V V⁻¹. Todas estas muestras se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 10 min para luego agregarles 0,4 ml de una mezcla 50:50 V V⁻¹ de reactivo de Fenol Folin Ciocalteau (Sigma) con agua destilada.

Después de agregar todos los reactivos, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 min y por último, se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro (Shimadzu UV—120-01) a una longitud de onda de 750 nm, utilizando cubetas de 3 ml de capacidad (Standard Ltd.) contra el blanco. Los valores de proteínas en las muestras problemas se calcularon por interpolación utilizando dicha curva patrón. El contenido de proteínas totales se expresó en pg cel⁻¹ correspondiendo al promedio de todas las réplicas.

Carbohidratos totales

La cuantificación de los carbohidratos se llevó a cabo por el método fenol sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). El precipitado de las microalgas, previamente conservado, se resuspendió en 4 ml de NaOH 1 mol l⁻¹; de esta solución se tomó 1ml

y se colocó en tubos de ensayo por triplicado. Al mismo tiempo se preparó el blanco con 1 ml de NaOH 1 mol l⁻¹. Se utilizó como estándar una solución de glucosa anhidra de 1 mg ml⁻¹ en NaOH 1 mol l⁻¹, esta solución de glucosa fue distribuida en tubos con diferentes volúmenes 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1 ml, que luego se enrasaron hasta un volumen de 1 ml con NaOH 1 mol l⁻¹. Los valores de absorbancia de la glucosa estándar se utilizaron para elaborar la curva patrón mediante un ajuste lineal por mínimos cuadrados.

A todos los tubos (muestras y curva patrón), se les añadió 1 ml de fenol al 80% y, una vez mezclados, se les agregó inmediatamente 5 ml de H₂SO₄ puro, agitándose rápido nuevamente, luego de enfriar se determinó la absorbancia a 485 nm, en un tiempo no mayor de 1 h.

Los valores de carbohidratos en las muestras problemas se calcularon por interpolación utilizando dicha curva. El contenido de carbohidratos totales se expresó en pg cel⁻¹ y correspondieron al promedio de todas las réplicas.

Lípidos totales

Para esta determinación de los lípidos totales se realizó un ensayo cuantitativo basado en la carbonización (Marsh y Weinstein, 1966), mientras que la extracción se realizó con la metodología descrita por Bligh y Dyer (1959), para lo cual se resuspendió el precipitado de microalgas en 7,5 ml de CHCl₃:CH₃OH (1:2 V:V); las muestras fueron homogeneizadas para facilitar la extracción. Seguidamente se les añadió 1,5 ml de CHCl₃ y 1,5 ml de agua destilada para separar la fase polar de la apolar. Los tubos se agitaron y se dejaron en reposo durante 24 h a 4°C. Posteriormente, éstos se centrifugaron por 10 min a 3 000 rpm para facilitar la separación de las fases antes mencionadas. La fase polar se descartó y la fase apolar se colocó en un tubo limpio, se adicionó 0,5 ml de acetona de alta pureza. El extracto

lipídico, de cada tubo, se sometió a desecación mediante la evaporación del CHCl_3 en una estufa a 37°C y luego se resuspendió nuevamente en 1 ml de CHCl_3 , el cual se repartió por triplicado, en alícuotas de 200 μl de cada uno de estos extractos en tubos con tapa de rosca. Paralelamente fue preparada una solución de tripalmitina en CHCl_3 (0,03–0,27 mg ml^{-1}) para ser utilizada como patrón. Los valores de absorbancia de tripalmitina sirvieron para la elaboración de la curva patrón mediante un ajuste lineal por mínimos cuadrados, y los valores de lípidos en las muestras problemas se calcularon por interpolación utilizando dicha curva. Una vez que las muestras de las microalgas, curva patrón y blanco (CHCl_3) se evaporaron a 37°C ; todos los tubos se dejaron enfriar para añadirles seguidamente 2 ml de H_2SO_4 concentrado. Luego, los tubos se colocaron dentro de la estufa a 200°C durante 15 min para la carbonización del extracto lipídico. A continuación, los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante unos 20 s e inmediatamente se colocaron a 4°C durante 5 min. Acto seguido, se les añadió 3 ml de agua destilada a cada tubo, se mezcló bien y se colocó nuevamente a 4°C . Una vez fríos, se colocaron a temperatura ambiente durante unos 10 min, hasta que desaparecieron todas las burbujas para determinar la absorbancia de las muestras a 375 nm en un espectrofotómetro (Spectronic Shimadzu UV - 120-01).

Los valores de absorbancia de tripalmitina sirvieron para la elaboración de la curva patrón mediante un ajuste lineal por mínimos cuadrados, y los valores de lípidos en las muestras problemas se calcularon por interpolación utilizando dicha curva. El contenido de lípidos totales se expresó en pg cel^{-1} y correspondieron al promedio de todas las réplicas.

Equivalentes energéticos de los carbohidratos, lípidos y proteínas

Los cambios ocurridos desde el punto de vista de la energía contenida en las microalgas (por célula) fueron determinados mediante la estimación de equivalentes energéticos de los diferentes componentes bioquímicos: carbohidratos, lípidos y

proteínas mediante la transformación de 17,16; 35 y 18 mJ, respectivamente, de acuerdo a los factores de conversión propuestos por Gnaige y Bitterlich (1984) y Whyte *et al.* (1990).

Análisis Estadísticos

Para evaluar la influencia del aceite en la microalga se consideró, para cada parámetro evaluativo, un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial. Se tomó como factores el tipo de aceite (usado y no usado), la concentración de la fracción acuosa del aceite (0, 50, 60, 70 y 80%) y el tiempo de exposición (0, 48 y 96 h). Los análisis que mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$), se les aplicó un análisis *a posteriori* de Duncan en función de establecer diferencias ($P < 0,05$) grupales entre los tratamientos. Previo a los análisis, se evaluó la normalidad y homogeneidad de varianzas (Zar, 1984).

RESULTADOS

La tabla 1 muestra los valores del bioensayo preliminar CI_{50} , con sus respectivos límites de confianza al 95%, para *Tetraselmis* sp. expuesta a aceites de motor de automóvil no usado y usado durante 96 h. Se obtuvo concentración inhibitoria media de 54,79% para el aceite no usado y 59,72% para el aceite usado, encontrándose ambos valores en un intervalo aproximado según los límites inferiores y superiores de una concentración de 30 a 95%, se eligió las concentraciones de 50, 60, 70, 80% para la prueba definitiva.

Tabla 1. Concentración inhibitoria media (CI_{50}) para la microalga *Tetraselmis* sp. a las 96 h de exposición a las fracciones acuosas del aceite automotriz (No usado y usado).

Aceites	CI_{50} (%)	Lím. Inf.	Lím. Sup.
No usado	54,79	36,12	90,63
Usado	59,72	33,84	94,39

Los resultados de los análisis estadísticos en cuanto a la influencia del aceite automotriz, en el tiempo experimental sobre el porcentaje de crecimiento de la microalga *Tetraselmis* sp., establecieron diferencias significativas ($P < 0,05$) en los factores concentración y tiempo, y diferencias no significativas ($P > 0,05$) para el factor aceite con interacciones significativas entre los factores aceite y tiempo, y entre los factores concentración y tiempo (Apéndice 1).

La figura 1 muestra los porcentajes del crecimiento celular de la microalga *Tetraselmis* sp. durante los tiempos de exposición a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz no usado y usado, en la cual se observa una tendencia igual en la respuesta ante los dos aceites, caracterizada por una observación

de no efecto al inicio del experimento (0 h) y un efecto de disminución de la densidad celular a medida que aumenta la concentración de los aceites, tanto a las 48 h como a las 96 h. El tratamiento a la concentración de 0% de los aceites presentó el incremento mayor de la densidad celular y por ende porcentaje mayor de crecimiento en todos los tiempos de exposición, siendo más alto a las 96 h para ambos aceites (no usado: $330,54 \pm 22,497\%$; usado: $299,04 \pm 29,874\%$), formando estadísticamente un solo grupo para el aceite según la prueba a *posteriori* (Apéndice 2). Para este momento, las tasas de crecimiento fueron de $0,018 \text{ div día}^{-1}$ para el aceite no usado y $0,016 \text{ div día}^{-1}$ para el aceite usado. La menor densidad celular se presentó en los tratamientos de 70 y 80% ante el xenobiótico, en todos los tiempos, los cuales conformaron un solo grupo significativo ($P > 0,05$; Apéndice 3) según la prueba *a posteriori* de los análisis estadísticos, resultando los valores más bajos en dichas concentraciones a las 96 h (70%: $81,79 \pm 10,021\%$ usado, $90,76 \pm 20,828\%$ no usado; 80%: $81,79 \pm 11,424\%$ usado, $75,43 \pm 12,322\%$ no usado). Para el 70% las tasas de crecimiento fueron de $0,005 \text{ div día}^{-1}$ para el aceite no usado y de $0,002 \text{ div día}^{-1}$ para el aceite usado y para el 80% de $0,002 \text{ div día}^{-1}$ y $0,003 \text{ div día}^{-1}$, respectivamente.

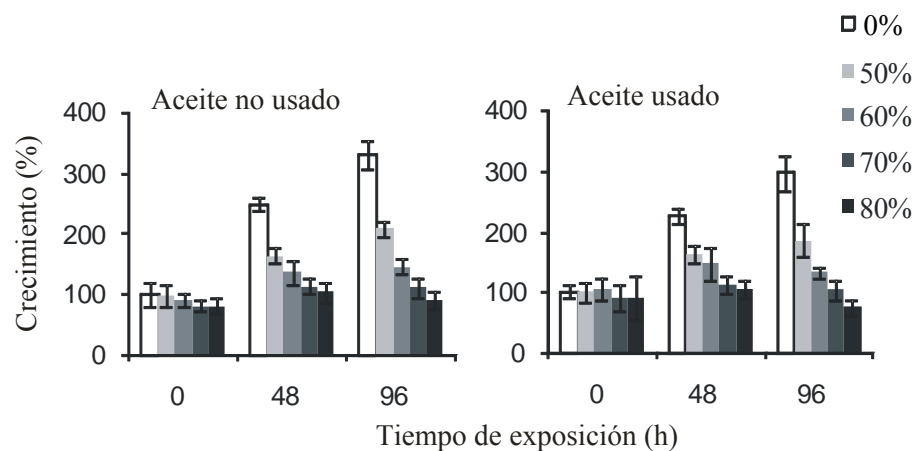


Figura1. Efecto de la fracción acuosa del aceite automotriz no usado y usado sobre el crecimiento de la microalga autóctona *Tetraselmis* sp. (G1)

El análisis estadístico reveló para los pigmentos (clorofila *a* y carotenos totales) diferencias significativas ($P < 0,05$) en todos los factores estudiados, presentando interacciones significativas entre el aceite y la concentración, y entre la concentración y el tiempo para la clorofila *a* (apéndice 5), e interacciones significativas entre el aceite y el tiempo, y entre la concentración y el tiempo, para los carotenoides totales (apéndice 9).

De manera similar que en el crecimiento celular, en los pigmentos (clorofila *a*: Fig. 2a y carotenos totales: Fig. 2b), el efecto de la concentración de los aceites muestra una tendencia a la disminución de los valores a medida que aumenta la concentración en el tiempo, particularmente a las 96 h. Para la clorofila *a*, ambas fracciones de aceites formaron dos grupos estadísticamente significativos ($P < 0,05$; Apéndice 6), resultando el tratamiento de 0% con mayor contenido de este pigmento ($1,326 \pm 0,08 \text{ pg cel}^{-1}$ para el aceite no usado y $1,24 \pm 0,176 \text{ pg cel}^{-1}$ para el aceite usado) a las 96 h del experimento. El tratamiento de 80% registró a las 96 h los mínimos valores de este parámetro para ambos aceites (no usado: $0,35 \pm 0,039 \text{ pg cel}^{-1}$ y usado: $0,41 \pm 0,070 \text{ pg cel}^{-1}$), el cual junto con los tratamientos 60 y 70% conforman un grupo significativo ($P < 0,05$; Apéndice 7) según prueba a *posteriori*.

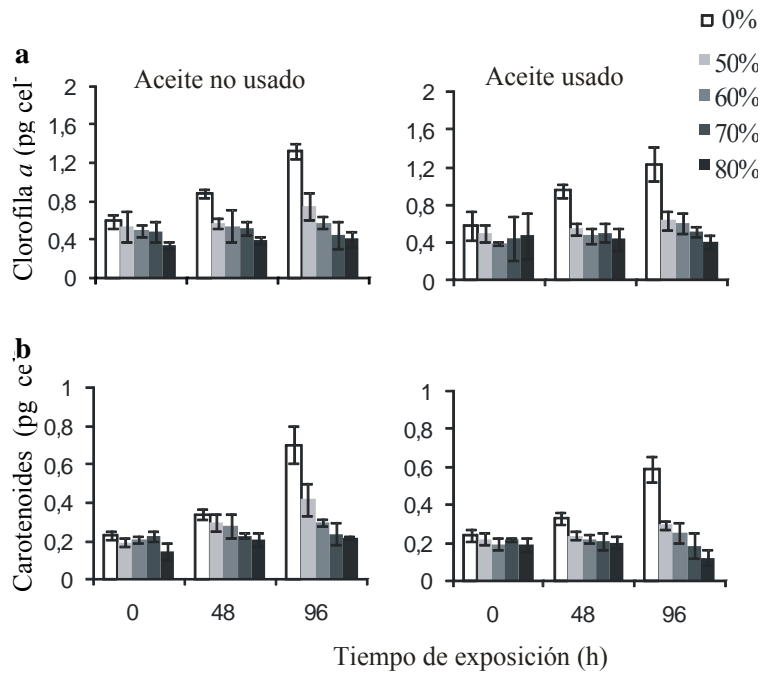


Figura 2. Efecto de la fracción acuosa del aceite automotriz no usado y usado sobre el contenido de clorofila a (a) y carotenoides totales (b) de la microalga autóctona *Tetraselmis* sp. (G1)

En el caso de los carotenoides totales se mostró diferencias significativas ($P > 0,05$; Apéndice 9), evidenciándose entre el 0% y los tratamientos con el tóxico, siendo estas diferencias más notables a las 96 h ($0,703 \pm 0,095$ pg cel⁻¹ aceite no usado y $0,588 \pm 0,069$ pg cel⁻¹ aceite usado). El tratamiento 80% se mantuvo significativamente con la menor concentración celular de este pigmento ($P < 0,05$; Apéndice 11), en todos los tiempos de exposición, indicando tener un efecto más severo a las 96 h para ambos aceites: no usado ($0,147 \pm 0,040$ pg cel⁻¹) y usado ($0,122 \pm 0,041$ pg cel⁻¹), lo que coincide con los resultados del efecto del aceite en la concentración de clorofila a (Fig. 2a).

Los análisis de los resultados de los componentes bioquímicos y la energía celular (Apéndices 13, 17, 21 y 25), muestran diferencias significativas ($P < 0,05$) para

las proteínas en los factores aceite y concentración, con interacciones sólo entre concentración y tiempo. Para los carbohidratos las diferencias se establecieron en los factores tiempo y concentración, con interacciones entre aceite y tiempo, y concentración y tiempo. En cuanto a los lípidos y la energía celular, se presentan diferencias significativas en todos los factores analizados, existiendo interacciones entre los factores concentración y tiempo sólo en los lípidos.

La figura 3 refleja el efecto del aceite ante la concentración de proteínas (a), carbohidratos (b), contenido lipídico (c) y la energía (d), a nivel celular de la microalga *Tetraselmis* sp. en los diferentes tiempos de exposición. En líneas generales, tanto para las proteínas como para los carbohidratos, se muestra un patrón de disminución de sus valores con el aumento de la concentración del tóxico (mínimos a 96 h - 80% proteínas: $31,24 \pm 3,951$ pg cel⁻¹ aceite no usado y $93,96 \pm 10,900$ pg cel⁻¹ aceite usado; carbohidratos: $6,96 \pm 1,313$ pg cel⁻¹ no usado y $7,87 \pm 0,431$ pg cel⁻¹ usado). En contraste, los lípidos y el contenido energético celular poseen un patrón diferente. En los lípidos existe un incremento de los valores proporcional a la concentración de los aceites, donde los tratamientos a 80% muestran la mayor concentración ($78,51 \pm 16,640$ pg cel⁻¹ para el aceite no usado y $80,09 \pm 13,683$ pg cel⁻¹) formando un grupo aislado significativamente mayor a los otros tratamientos ($P < 0,05$; Apéndice 23). En la energía celular, los valores se mantienen, en forma general, entre las concentraciones de los aceites, conformando un grupo significativo ($P < 0,05$; Apéndice 27) de valores mayores los tratamientos con tóxicos ($> 4 \mu\text{J}$).

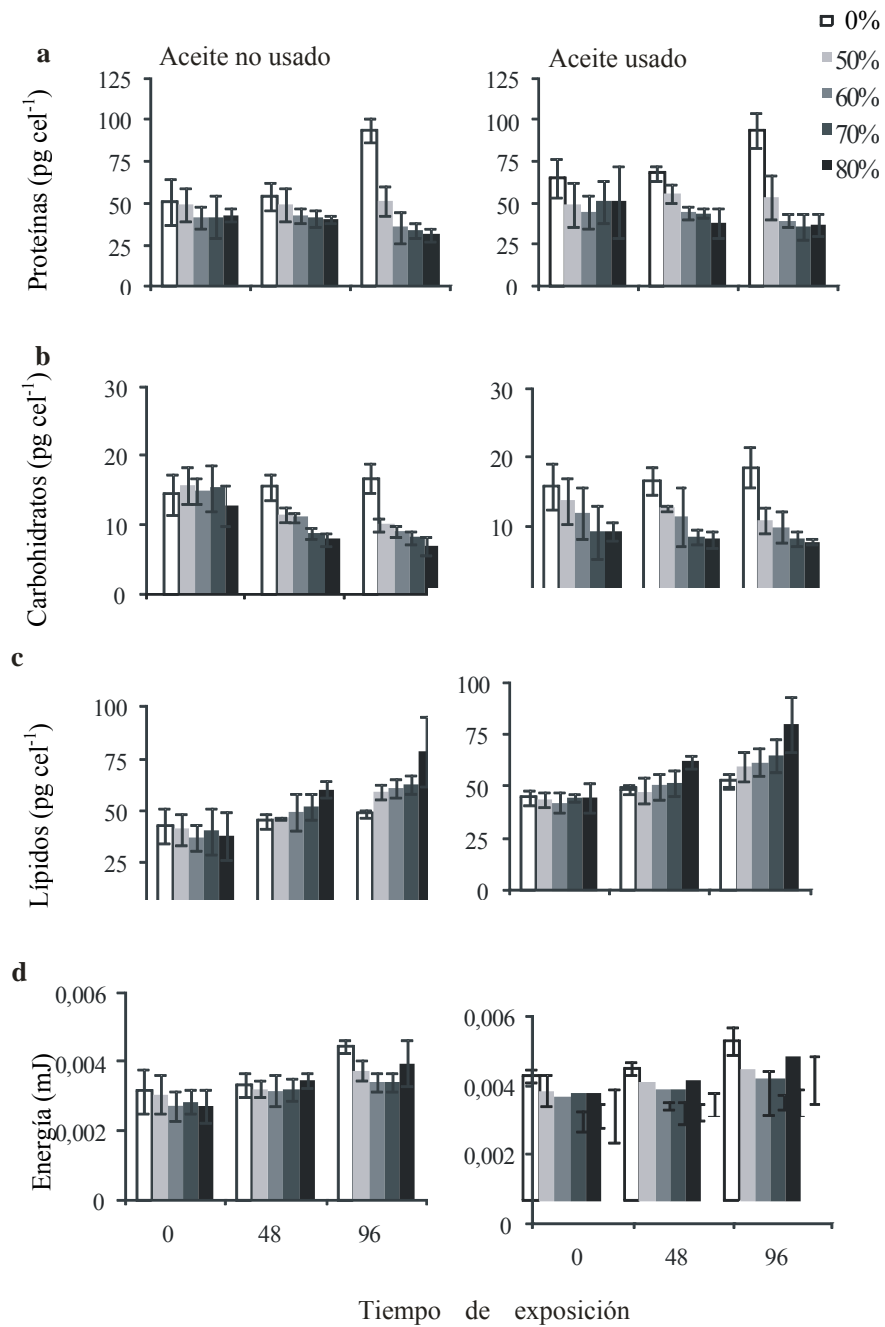


Figura 3. Efecto de la fracción acuosa del aceite automotriz no usado y usado sobre el contenido de proteínas (a), contenido de carbohidratos (b), lípidos totales (c) y la energía (d) de la microalga autóctona *Tetraselmis* sp. (G1).

DISCUSIÓN

La exposición de microorganismos fotosintéticos al petróleo, ya sea a crudos totales, fracciones solubles a productos derivados en condiciones ambientales involucran efectos de sensibilidad, resistencia o toxicidad de los mismos, en las diferentes microalgas.

En el presente estudio no se analizaron los componentes de los aceites tanto usado como no usado, sin embargo se ha reportado que un aceite lubricante virgen (no usado) está constituido por lo general por hidrocarburos como alcanos, ciclo alcanos e hidrocarburos aromáticos, así como otras sustancias como ditiosfosfatos, fenoles, aminas, sulfonatos, fosfonatos, fenolatos, compuestos clorados entre otros (Nuñez, 2001). Además de los compuestos presentes en el aceite no usado, el usado presenta sustancias que se forman en presencia de altas presiones y temperaturas debido a alteraciones por el funcionamiento del motor que generan sustancias por el desgaste del mismo tales como, metales pesados (plomo, cadmio, cromo, arsénico y zinc) y solventes clorados (tricloroetano, tricloroetileno, percloroetileno y naftalenos), los cuales son potencialmente tóxicos (Pruell y Quinn, 1988; Nuñez, 2001).

La determinación de la concentración inhibitoria media (CI_{50}) para cada aceite en este estudio; resultó 54,79% para el aceite no usado y 59,72% para el aceite usado, lo cual refleja valores similares para ambos contaminantes y establece una relación entre la concentración del tóxico y la respuesta de la microalga. Esta similar respuesta de la microalga ante los tóxicos en el experimento preliminar, también se observó en los bioensayos, en los diferentes parámetros evaluados.

Entre los parámetros que pueden indicar un efecto tóxico de los agentes contaminantes sobre estos organismos, el más estudiado es la densidad de células. En el presente estudio la microalga *Tetraselmis* sp., expuesta a las diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (no usado y usado) durante 96 h, revela una disminución notable del porcentaje de crecimiento en relación al tratamiento de 0%, especialmente a las 48 y 96 h del experimento y más evidente a altas concentraciones, lo cual indica cierta sensibilidad de esta microalga ante el agente estresor.

Los resultados de disminución del crecimiento en microalgas por efectos de fracciones acuosas de petróleo y otros derivados han sido reportados ampliamente (Gaur y Kumar, 1981; Tukaj, 1987; Liebe y Fock, 1992, Ansari *et al.*, 1997; Phatarpekar y Ansari, 2000; Gamal-El-Din *et al.*, 2005). Muchos de estos estudios explican el por qué de esta situación: Ansari *et al.* (1997) y Phatarpekar y Ansari (2000) estudiaron la inhibición del crecimiento en *Tetraselmis gracilis* e *Isochrysis* sp., respectivamente, cuando son expuestas a altas concentraciones de fracciones acuosas de crudo y derivados (petróleo, querosen), indicando que los resultados encontrados se deben a la presencia de hidrocarburos aromáticos en estos tóxicos. Gamal-El-Din *et al.* (2005) exponen que a mayor concentración de la fracción acuosa de un diesel, menor es el crecimiento de la microalga *Nannochloropsis salina*, debido a un efecto metabólico asociado a la inhibición de enzimas, fotosíntesis, respiración, síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, o retraso de la división celular.

Fábregas *et al.* (1984) al evaluar la fracción soluble obtenida de petróleo, encontraron que no hubo efecto en el crecimiento de la microalga *Tetraselmis suecica* en ninguna de las concentraciones ensayadas, e incluso encontraron en algunos casos una ligera estimulación del crecimiento de esta microalga, concluyendo que bajas concentraciones de petróleo y derivados puede estimular el crecimiento algal. Nyholm y Källqvist (1989), soportan esta observación exponiendo que a

concentraciones más bajas de tóxicos puede ocurrir una estimulación de crecimiento, previa a la respuesta inhibitoria de concentraciones mayores. No hay consenso para explicar estas respuestas, que pueden ser resultados de estrés fisiológico inducido por el tóxico. En nuestro estudio, no pudimos visualizar este efecto, debido a que las concentraciones utilizadas fueron mayor del 50%, causando siempre efectos negativos.

La fracción soluble del aceite automotriz podría asociarse a la disminución de la capacidad fotosintética de las microalgas, debido a la disminución significativa del contenido de clorofila *a* y carotenoides totales en los tratamientos de exposición (aceite no usado y aceite usado), específicamente a las 96 h del experimento, siendo más notable este efecto en el tratamiento 80%. Estos resultados concuerdan con los de Briceño (2004) al estudiar la influencia del querosen sobre dos cianobacterias, obteniendo una disminución del contenido celular de clorofila *a* y carotenoides totales. Armstrong y Calder (1978) sostienen la idea de que el efecto tóxico del crudo y de refinados puede estar dirigido más a la interferencia con la cadena transportadora de electrones que a la molécula de clorofila. Morales-Loo y Goutx (1990), indican en su trabajo las posibles razones de los efectos de crudos y derivados sobre pigmentos fotosintéticos, ya que evidenciaron una disminución del contenido de clorofila *a* y otros pigmentos en *Asterionella glaciales*, *Rhodomonas lens* y *Dunaliella tertiolecta* que posiblemente está relacionado con daños en los cloroplastos e inhibición de la biosíntesis de la molécula de clorofila. Una hipótesis alternativa de éste daño al sistema fotosintético, es soportado por Zambrano y Carballeira (1999) y Paixão *et al.* (2007), quienes hacen énfasis a que la disminución de pigmentos fotosintéticos en las microalgas cuando son sometidas a hidrocarburos de petróleos o derivados de petróleo como la gasolina, puede deberse a la inhibición de la fluorescencia de la molécula de clorofila, lo que conlleva a efectos nocivos sobre la producción de energía fotosintética o fotoquímica.

Gamal-El-Din *et al.* (2005), exponen que a mayor concentración de la fracción acuosa de un diesel mayor es el contenido de clorofila *a*, debido a la acumulación del contaminante en las células y el aumento del volumen celular casi al doble de su tamaño original, lo que ocasiona que también se doble la producción de dicho pigmento en la microalga usada *Nannochloropsis salina*. En la presente investigación, no se observó este comportamiento, ya que se manifestó una disminución del contenido de pigmento con el aumento de la concentración del contaminante, indicando efectos de disminución de las capacidades fisiológicas de la microalga, corroborando la sensibilidad del alga utilizada (*Tetraselmis* sp.).

La composición bioquímica puede ser tomada como un índice fisiológico, ya que sus modificaciones pueden reflejar alteraciones metabólicas importantes en el desarrollo del cultivo (Fabregas *et al.* 1984; Cortez, 2007). Los resultados obtenidos en este estudio revelan dos patrones de respuestas ante la concentración del xenobiótico de las tres macromoléculas estudiadas (proteínas, carbohidratos y lípidos): un patrón de disminución del contenido celular de proteínas y carbohidratos, y un patrón de incremento de los lípidos totales de la microalga en proporción a las concentraciones del contaminante, registrándose el efecto a las 48 y 96h del bioensayo.

La disminución del contenido de proteínas evidenciada en este estudio posiblemente se deba a la alteración del anabolismo proteico por efectos del contaminante, unido al posible desgaste del medio, con poca concentración de nitrógeno (ya que los efectos son más evidentes a las 48 y 96h), por lo que las microalgas degradarían preferiblemente otras moléculas que contengan nitrógeno dando como resultado un descenso significativo en el contenido celular de las proteínas, como lo es reportado por Abalde *et al.* (1995).

Las respuestas de los derivados de petróleo en la concentración de proteínas

de microalgas ha sido diversa, ya que a diferencia de los resultados obtenidos en esta investigación, se ha reportado un incremento en el contenido celular de proteínas al exponer microalgas (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Cynechocystis minuscula* y *Limnothryx* sp.) en presencia de agentes como iso-octanos extraídos de diesel y fracción soluble de petróleo y querosen (Liebe y Fock, 1992; Briceño, 2004). La adición de este tipo de contaminantes en los cultivos de microalgas posiblemente puede ocasionar un aumento considerable de la población bacteriana, lo que conlleva a la utilización de estos derivados hidrocarbonados como fuente de carbono, lo que pudo haber causado un incremento de proteínas (Semple *et al.*, 1999; Al-Hasan *et al.*, 2001).

Los bajos niveles de carbohidratos de la microalga obtenidos como resultados de la influencia del aceite automotriz concuerda con los resultados reportados por Gamal-El-Din *et al.* (2005), en donde se presencié una disminución de los carbohidratos, específicamente del β -glucano, que es el principal polisacárido de reserva de la microalga *Nannochloropsis salina*, debido a que el estrés ejercido por este tipo de contaminante afecta el funcionamiento del fotosistema II causando posibles modificaciones en los productos obtenidos durante la fotosíntesis, lo que puede provocar una disminución de los carbohidratos en las microalgas.

Soto *et al.* (1977) encontraron resultados contrarios a los presentados en esta investigación, ya que el contenido celular de carbohidratos de *Chlamydomonas angulosa* permaneció constante cuando fue tratado con extractos solubles del crudo Bow River, e inclusive observaron un incremento del contenido celular de carbohidratos de esa microalga cuando fueron expuestas a naftaleno y extractos acuosos de crudo. Briceño (2004) también encontró en su trabajo un patrón similar en el contenido de carbohidratos registrando un ligero incremento al exponer a una cianobacteria al 3% de querosen. Este efecto puede deberse a que las concentraciones usadas por Soto *et al.* (1977) y Briceño (2004) fueron menores a las utilizadas en este

estudio, no consiguiendo umbrales de toxicidad. Una hipótesis alternativa es que dichas diferencias se deben a la variabilidad y plasticidad de las adaptaciones de los microorganismos ante agentes estresores o contaminantes (Cortez, 2007).

Las observaciones encontradas en este estudio con respecto al incremento de lípidos se corresponden con los resultados encontrados por Cortez (2007), al evaluar la influencia de la fracción acuosa del petróleo crudo sobre tres microalgas; indicando que un efecto de aumento de lípidos puede deberse a la acumulación de éstos, como suele ocurrir en microorganismos unicelulares cuando se enfrentan a agentes estresores, lo que conduce a la disminución del crecimiento, generando la disminución de la síntesis de proteínas y el consumo de carbohidratos; de esta forma, el metabolismo celular cambia la producción reservas de energía tipo carbohidratos a material de reserva tipo lipídico.

Este incremento significativo de los lípidos totales en la microalga ante la exposición del tóxico ha sido registrado en microalgas también por otros autores (Soto *et al.*, 1977; Al Hasan *et al.*, 1994; Nechev *et al.*, 2002; Briceño, 2004), lo que soporta los resultados encontrados en este estudio. Una de las posibles causas de esta situación es que la fracción soluble de estos xenobióticos interrumpen el estado físico óptimo de la membrana citoplasmática permitiendo la acumulación de lípidos en la célula lo que facilita la entrada de la fracción acuosa del aceite automotriz, la acumulación de hidrocarburos y el incremento del volumen celular (Nechev *et al.*, 2002). Este daño en la membrana, repercute en el control del transporte de iones dentro y fuera de la célula optando por la acumulación preferiblemente de lípidos (Zambrano y Carballeira 1999).

Los resultados indican que, aún mostrando un incremento en lípidos (moléculas con el mayor valor energético) por el efecto de los xenobióticos, el balance energético celular fue menor cuando las microalgas fueron expuestas a las

concentraciones de los aceites, sin detectar diferencias significativas en dichas concentraciones, lo cual muestra una limitante de sensibilidad para usar el contenido energético celular como un índice fisiológico para pruebas toxicológicas en microalgas. En este sentido, se sugiere la utilización del análisis de concentración celular de lípidos totales, dada su mayor sensibilidad ante la exposición al xenobiótico tanto en el tipo de aceite, como en su concentración y el tiempo del bioensayo, conjuntamente con pruebas de densidad celular para el análisis del efecto tóxico en microalgas.

Los resultados indican una evidente influencia de la fracción acuosa del aceite automotriz en la fisiología de la microalga *Tetraselmis* sp., particularmente a las 48 y 96h del experimento y especialmente a altas concentraciones del contaminante (>50%).

De manera general, los derivados del petróleo como el aceite automotriz (aceite no usado y usado) ejercen efectos tóxicos sobre organismos como las microalgas, como ha sido observado en el presente estudio. Los efectos de cada aceite son similares en cada uno de los parámetros fisiológicos evaluados en *Tetraselmis* sp., por lo tanto se sugiere que poseen el mismo nivel tóxico y sus efectos son más notables a altas concentraciones (80%). Estos resultados son consecuentes con visualizar los efectos del aceite automotriz son menos dramáticos que los ejercidos por otros tipos de contaminantes; sin embargo, son fuentes de hidrocarburos en los medios acuáticos y posibles factores de mutagenicidad y otros daños a la biota en estos ambientes, tal como es sugerido por Bott y Rogenmuser (1978).

CONCLUSIONES

Las fracciones del aceite automotriz no usado y usado ejercen un efecto similar sobre los parámetros fisiológicos evaluados en *Tetraselmis* sp.

El crecimiento de la microalga estudiada es inhibido por la fracción acuosa del aceite.

El contaminante influyó en los procesos fotosintéticos de *Tetraselmis* sp., al disminuir el contenido de clorofila a y carotenoides totales de la microalga.

La composición bioquímica de la microalga mostró dos patrones de respuestas bajo el efecto de la fracción acuosa del aceite automotriz; uno de disminución de proteínas y carbohidratos y el otro de incremento de los lípidos totales.

De los tres componentes bioquímicos, incluyendo su transformación energética para determinar la energía celular, la concentración celular de lípidos fue el índice fisiológico que mostró mayor sensibilidad ante el efecto de los aceites.

Los efectos de la fracción acuosa del aceite automotriz (no usado y usado) sobre la microalga *Tetraselmis* sp. son más notables a altas concentraciones (>50%) a las 48 y 96 h.

RECOMENDACIONES

En la presente investigación se planteó un objetivo que, aunque se trató de desarrollar con varias instituciones, dentro y fuera de la Universidad de Oriente, no pudo cumplirse, por lo que se recomienda, para un mejor entendimiento del efecto de estos fluidos determinar la composición, particularmente de hidrocarburos y metales pesados.

Se recomienda la incorporación de *Tetraselmis* sp. para estudios toxicológicos donde intervengan xenobióticos de origen hidrocarburos, debido a la sensibilidad y facilidad en el manejo de estos organismos con las pruebas toxicológicas desarrolladas.

Debido a la mayor sensibilidad ante el xenobiótico se sugiere la utilización de la composición de lípidos como índice fisiológico para determinar el efecto tóxico en microalgas.

Para el conocimiento de otros efectos en la fisiología de las microalga de estos contaminantes se propone otros estudios fisiológicos, que incluyan morfometría celular.

Se sugiere la realización de este tipo de estudios en otras cepas de microalgas y otros organismos de otros estratos de la cadena trófica para tener un mejor conocimiento de sus posibles efectos.

Promover la creación de leyes y normas gubernamentales con respecto a la disposición y manejo de estos desechos que significan contaminación a nuestros ambientes acuáticos.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.; Pereira, S.; Sousa, E. y Brasil-Lima, G. 2002. Testes de toxicidade con microalgas. En: *Métodos em Ecotoxicologia marinha: Aplicações no Brasil*. Nascimento, L.; Sousa, E. y Nipper, M. (eds). Editora Artes Gráficas e Indústria. Sao Paulo. 51-62.
- Al-Hasan, R.; Khanafer, M.; Eliyas, M. y Radwan S. 2001. Hydrocarbon accumulation by picocyanobacteria from the Arabian Gulf. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 533-540.
- Anderson, B. 1944. Toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as determined by the use of *Daphnia magna*. *Sew. Work J.*, 16:1156-1165.
- Ansari, Z.; Saldanha, M. y Rajkumar, R. 1997. Effects of petroleum hydrocarbons on the growth of a microalga, *Isochrysis* sp. (Chrysophyta). *J. Mar. Sci.*, 26: 372-376.
- Armstrong, J. y Calder, J. 1978. Inhibition of light-induced pH increase and O₂ evolution of marine microalgae by water-soluble components of crude and refined oils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 858-862.

- ATSDR (Agencia para las Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades de los EE.UU.). 1997. "Resumen de salud pública: Aceite de motor usado". "ATSDR". <<http://www.atsdr.cdc.gov/es>> (20/10/10).
- Bartell, S.; Gardner, R. y O'Neil, R. 1992. *Ecological risk estimation*. Lewis Publishers. Boca Raton, USA.
- Blaise, C. 1991. Microbiotests aquatic ecotoxicology: characteristics, utility and prospects. *Toxic. Asses.*, 6: 145-155.
- Bligh, E. y Dyer, W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917.
- Botello, A. 1978. Presencia e importancia de hidrocarburos fósiles en el medio ambiente marino: Nota científica. *Cs del Mar*, 50: 250-255.
- Bott, T. y Rogenmuser, K. 1978. Effects of N° 2 fuel oil, Nigerian crude oil, and used crankcase oil on attached algal communities: acute and chronic toxicity of water soluble constituents. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36(5):673-682.
- Briceño, B. 2004. Cambios fisiológicos y morfológicos de las cianobacterias *Cynehocystis minuscula* y *Limnothryx* sp. sometidas a diferentes concentraciones de queroseno y de fracción soluble de petróleo. Trabajo de Postgrado. Facultad Experimental de Ciencias. LUZ. Maracaibo. Venezuela.
- Burton Jr, G. 1992. *Sediment Toxicity Assesment*. Lewis Publishers. Boca Raton, USA.

- Carr, R. y Chapman, D. 1992. Comparison of solid- phase and pore-water approaches for assesing the quality of marine and estuarine sediments. *Chem. Ecol.*, 7: 19-30.
- Cordero, J.; Guevara, M.; Morales, E. y Lodeiros, C. 2005. Efectos de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). *Rev. Biol. Trop.*, 53(3-4): 325-330.
- Correia, A., Costa, M., Luis, O. y Livingstone, D. 2003. Age-related changes in the antioxidant enzymes activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 289: 83-101.
- Cortez, R. 2007. Efecto del petróleo sobre el crecimiento y composición bioquímica de tres microalgas autóctonas del Nororiente de Venezuela. Trabajo de Pregrado. Departamento de Biología. Universidad de Oriente, Cumaná. Venezuela.
- Dubois, M.; Gilles, K.; Halmilton, J.; Rebers, P. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for detetermination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 2: 350-356.
- 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.
- Fabregas, J.; Herrero, C.; Cabezas, B. y Abalde, J. 1986. Biomass production and biochemical composition in mass cultures of the marine microalgae.

- Isochrysis galbana Parke at varying nutrient concentration. *Aquacul.*, 53: 101 - 113.
- Fábregas, J.; Herrero, C.; Veiga, M. 1984. Effect of oil and dispersant on growth and chlorophyll *a* content of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 445-447.
- Gamal-El-Din, N.; Chen, Y.; Aly-El-Mahdy, A. y Farag, R. 2005. Physiological responses of the Eustigmatophycean *Nannochloropsis salina* to aqueous diesel fuel pollution. *Oceanol.*, 47(1): 75-92.
- Gaur, J. y Kumar, H. 1981. Growth response of four micro-algae to three crude oils and furnace oil. *Environ. Pollut.*, 25: 77-85.
- Gnaige, E. y Bitterlich, G. 1984. Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept. *Oecolo.*, 62: 289-298.
- Goldberg, A. y Frazier, J. 1989. Alternatives to animals in toxicity testing. *Sci. Amer.*, 26: 24-30.
- Hellou, J.; Warren, W.; Andrews, G.; Mercer, G.; Payne, J. y Howse, D. 1997. Long term fate of crankcase oil in rainbow trout: A time-and dose-response study. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1295-1303.
- Helm, M. 1977. Mixeel algal feeding of *Ostrea edulis* larvae with *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis suecica*. *J. Mar. Biol.*, 57: 1019-1029.

- Hunn, J. 1989. *History of Acute Toxicity Test with Fish, 1963-1987*. Invest. Fish Dep. Inter., Fish Wildl. Sen'. La Crosse, WI. USA.
- Herbert, D.; Phipps, P. y Stranse, R. 1971. Chemical analysis of microbial cells. *Meth. Microbiol.*, 5: 209-244.
- Jeffrey, S. y Humphrey, G. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b c₁, and c₂ in higher plants, algae and natural populations. *Biochem. Physiol. Pflazen.*, 167: 191-194.
- Korte, F. y Bedefed, J. 1978. Ecotoxicology review of global impact of petroleum industry and its products. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2: 55-103.
- Lemaire, P. y Livingstone, D. 1997. Aromatic hydrocarbon quinone-mediated reactive oxygen species production in hepatic microsomes of the flounder (*Platichthys flesus* L). *Com. Biochem. Physiol.*, 107C (2): 131-137.
- Liebe, B. y Fock, H. 1992. Growth and adaptation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* on diesel exhaust particle extracts. *J. General Microbiol.*, 138: 973-978.
- Liu, D. y Dutka, B. 1984. Toxicity screening procedures using bacterial systems. En: *Toxicity evaluation of heavy metals in phytoplankton*. La Crosse, WI. USA.
- Livingstone, D. 2001. Contaminant –stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 42 (8): 656-666.
- Lowry, O.; Rosebrough, U.; Faff, A. y Randall, R. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol. Chem.*, 193: 265-275.

- Madigan, M.; Martinko, J. y Parker, J. 1999. *Biología de los microorganismos*. Octava edición revisada. Prentice Hall, Madrid.
- Marín N.; Lodeiros, C.; Verginelli, R. 1994. Cultivo de microalgas y el rotífero *Brachionus plicatilis* en gran escala. *Acta Cient. Venez.*, 45: 226-230.
- Marsh, J. y Weinstein, D. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipids Res.*, 7: 574-592.
- McCarty, E. y Mackay, D. 1993. Enhancing ecotoxicological modeling and assessment: body residues and modes of toxic action. *Environ. Sci. Technol.*, 27: 1719-1728.
- Morales-Loo, M. y Goutx, M. 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.
- Munkittrick, K. y Dixon, D. 1989. Use of white sucker *Catostomus commersoni* populations to assess the health of aquatic ecosystems exposed to low-level contaminant stress. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46: 1455-1462.
- Nascimento, I.; Sousa, E. y Nipper, M. 2002. *Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil*. Editora Artes Gráficas e Indústria. Sao Paulo. 262.
- Nechev, J.; Khotimchenko, S.; Ivanova, A.; Stefanov, K.; Dimitrova-Konaklieva, S.; Andreev S. y Popov, S. 2002. Effect of diesel fuel pollution on the lipid composition of some wide-spread black sea algae and invertebrates. *Z. Natûr.* 57(C):339-343

- Ngabe, B.; Bidleman, T. y Scott, G. 2000. Polycyclic hydrocarbon in storm runoff from urban and coastal South Caroline. *Sci. Total. Environ.*, 225: 1-9.
- Nipper, M; Bardaró-Pedroso, C. y José, V. 1990. Marine bioassays and their applications in coastal management and biological monitoring. En: *Simposio sobre Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira: Estrutura, Função e manejo, 2. Anais. Lindóia*, 23: 160-168.
- Nyholm, N. y Källqvist, T. 1989. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 18: 679-703.
- Nuñez, M. 2000. Evaluación de dietas de microalgas autóctonas en la alimentación del camarón *Penaeus vannamei*. Trabajo de Pregrado. Departamento de Biología. Universidad de Oriente, Cumaná. Venezuela.
- Nuñez, M. 2001. Aceite generado por motores en la ciudad de Cali. Alternativas de uso. *BORSI.*, 3: 4-14.
- Paixão, J.; Nascimento, I.; Pereira, S.; Leite, M.; Carvalho, G.; Silveira, J.; Rebouças, M.; Matias, G. y Rodrigues, J. 2007. Estimating the gasoline components and formulations toxicity to microalgae (*Tetraselmis chuii*) and oyster (*Crassostrea rhizophorae*) embryos: An approach to minimize environmental pollution risk. *Environ. Res.*, 163: 365-374.
- Phatarpekar, P. y Ansari, Z. 2000. Comparative toxicity of water soluble fractions of four oils on the growth of a microalga. *Bot. Mar.*, 43: 367-375.

- Prósperi, C. 2000. Uso de algas como indicadores de contaminación acuática. *Revista Agua*, 128: 61 – 63.
- Pruell, R. y Quinn, J. 1998. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in crankcase oil. *Environ. Pollut.*, 49: 89-97.
- Semple, K.; Cain, R. y Schmidt, S. 1999. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170: 291-300.
- Soto, C.; Hellebust, J. y Hutchinson, T. 1977). Effect of naphthalene and aqueous crude oil extracts on the green flagellate *Chlamydomonas angulosa*. III. Changes in cellular composition. *Can. J. Bot.*, 53: 2765-2777.
- Sousa, E. 2002. Toxicología marinha: histórico. En: *Métodos em Ecotoxicologia marinha: Aplicações no Brasil*. Nascimento, L.; Sousa, E. y Nipper, M (eds). Editora Artes Gráficas e Indústria. Sao Paulo. 9-11.
- Strickland, J. y Parsons, T. 1972. *A practical handbook of seawater analysis*. Fisheries research board of Canada. *Bulletin 167*. Segunda edición. Ottawa.
- Suter II, G. 1993. *Ecological Risk Assessment*. Lewis Publishers. Boca Raton, USA.
- 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.
- Villamar, F. 1996. Bioensayo de toxicidad (CL₅₀) del dispersante de petróleo BP 1100 WD, con fitoplancton marino (*Tetraselmis* sp). *Acta Oceanog. Pacíf.*, 8: 67-73.

- Walsh, G. 1988. Principles of toxicity testing with marine unicellular algae. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 7: 979-987.
- Wells, P.; Lee, K. y Blaise, C. 1998. *Microscale aquatic toxicology-advances, techniques and practice*. CRC Lewis Publishers. Boca Raton, USA.
- Whyte, J.; Englar, J. y Carswell, B. 1990. Biochemical composition and energy reserves in *Crassostrea gigas* exposed to different levels of nutrition. *Aquacul.*, 90: 157-172.
- Zambrano, J. y Carballeira, A. 1999. Effects of hydrocarbons on the physiology and growth of *Ulva* sp. (Chlorophyta). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 15(1-4): 373-384.
- Zar, J. 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Englewoods Cliff, New Jersey. USA.

APÉNDICES

Apéndice 1. Resumen del análisis de varianza del crecimiento de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Radio F	Valor P
Aceites	474,197	1	1,67	0,2005
Concentración	184041,0	4	162,10	0,0000
Tiempo	93116,8	2	164,03	0,0000
Acei-Conc	1109,5	4	0,98	0,4258
Acei-Tiem	2330,02	2	4,10	0,0208
Conc-Tiem	90893,7	8	40,03	0,0000
Residuo	19300,6	68		
Total	391266,0	89		

P<0,05* significativo

Apéndice 2. Resumen del análisis *a posteriori* de Duncan (P<0,05) del crecimiento de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Aceites	Promedios	Grupos homogéneos
Usado	136,093	
No usado	140,684	

Apéndice 3. Resumen del análisis a *posteriori* de Duncan ($P < 0,05$) de las diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) que afecta el crecimiento de *Tetraselmis* sp., a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Concentración	Promedios	Grupos homogéneos
80	91,4298	
70	102,317	
60	126,206	I
50	154,08	I
0	217,909	I

Apéndice 4. Resumen del análisis a *posteriori* de Duncan ($P < 0,05$) del crecimiento de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Tiempo	Promedios	Grupos homogéneos
0	93,8276	I
48	152,751	I
96	168,587	I

Apéndice 5. Resumen del análisis de varianza del contenido de clorofila *a* de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Radio F	Valor P
Aceites	1,69606	1	175,79	0,0000
Concentración	1,22253	4	31,68	0,0000
Tiempo	0,533546	2	27,65	0,0000
Acei-Conc	0,340895	4	8,83	0,0000
Acei-Tiem	0,023127	2	1,20	0,3079
Conc-Tiem	0,622748	8	8,07	0,0000
Residuo	0,656095	68		
Total	5,095	89		

P<0,05* significativo

Apéndice 6. Resumen del análisis *a posteriori* de Duncan (P<0,05) del contenido de clorofila *a* de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Aceites	Promedios	Grupos homogéneos
Usado	0,583452	I
No usado	0,308897	I

Apéndice 7. Resumen del análisis a *posteriori* de Duncan ($P < 0,05$) de las diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) que afecta el contenido de clorofila *a* de *Tetraselmis* sp., a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Concentración	Promedios	Grupos homogéneos
80	0,382736	
70	0,360008	
60	0,379459	
50	0,434708	
0	0,673961	I

Apéndice 8. Resumen del análisis a *posteriori* de Duncan ($P < 0,05$) del contenido de clorofila *a* de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Tiempo	Promedios	Grupos homogéneos
0	0,362171	I
48	0,428176	I
96	0,548176	I

Apéndice 9. Resumen del análisis de varianza del contenido de carotenos totales de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Radio F	Valor P
Aceites	0,0259174	1	14,65	0,0003
Concentración	0,532926	4	75,32	0,0000
Tiempo	0,234728	2	66,35	0,0000
Acei-Conc	0,00317636	4	0,45	0,7728
Acei-Tiem	0,0353223	2	9,98	0,0002
Conc-Tiem	0,401998	8	28,41	0,0000
Residuo	0,120286	68		
Total	1,35435	89		

$P < 0,05$ * significativo

Apéndice 10. Resumen del análisis *a posteriori* de Duncan ($P < 0,05$) del contenido de carotenos totales de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Aceites	Promedios	Grupos homogéneos
Usado	0,248596	I
No usado	0,282536	I

Apéndice 11. Resumen del análisis *a posteriori* de Duncan ($P < 0,05$) de las diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) que afecta el contenido de carotenos totales de *Tetraselmis* sp., a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Concentración	Promedios	Grupos homogéneos
80	0,180787	I
70	0,218933	
60	0,243951	
50	0,278561	I
0	0,405598	I

Apéndice 12. Resumen del análisis *a posteriori* de Duncan ($P < 0,05$) del contenido de carotenos totales de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Tiempo	Promedios	Grupos homogéneos
0	0,208514	I
48	0,25574	I
96	0,332445	I

Apéndice 13. Resumen del análisis de varianza del contenido de proteínas de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Radio F	Valor P
Aceites	531,742	1	6,57	0,0126
Concentración	12449,5	4	38,47	0,0000
Tiempo	127,728	2	0,79	0,4583
Acei-Conc	118,716	4	0,37	0,8314
Acei-Tiem	74,7715	2	0,46	0,6319
Conc-Tiem	5728,52	8	8,85	0,0000
Residuo	5501,65	68		
Total	24532,7	89		

P<0,05* significativo

Apéndice 14. Resumen del análisis *a posteriori* de Duncan (P<0,05) del contenido de proteínas de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Aceites	Promedios	Grupos homogéneos
Usado	51,4788	I
No usado	46,6174	I

Apéndice 15. Resumen del análisis *a posteriori* de Duncan (P<0,05) de las diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) que afecta el contenido de proteínas de *Tetraselmis* sp., a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Concentración	Promedios	Grupos homogéneos
80	40,0045	
70	41,2526	
60	41,4726	
50	51,4151	
0	71,0956	

Apéndice 16. Resumen del análisis *a posteriori* de Duncan ($P < 0,05$) del contenido de proteínas de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Tiempo	Promedios	Grupos homogéneos
0	48,7014	
48	47,7936	
96	50,6492	

Apéndice 17. Resumen del análisis de varianza del contenido de carbohidratos de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Radio F	Valor P
Aceites	3,76727	1	0,87	0,3550
Concentración	609,648	4	35,08	0,0000
Tiempo	121,795	2	14,02	0,0000
Acei-Conc	31,1192	4	1,79	0,1408
Acei-Tiem	54,889	2	6,32	0,0030
Conc-Tiem	107,507	8	3,09	0,0049
Residuo	295,405	68		
Total	1224,13	89		

$P < 0,05$ * significativo

Apéndice 18. Resumen del análisis *a posteriori* de Duncan ($P < 0,05$) del contenido de carbohidratos de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Aceites	Promedios	Grupos homogéneos
Usado	11,5449	
No usado	11,9541	

Apéndice 19. Resumen del análisis *a posteriori* de Duncan ($P < 0,05$) de las diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) que

afecta el contenido de carbohidratos de *Tetraselmis* sp., a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Concentración	Promedios	Grupos homogéneos
80	8,86738	
70	9,75465	
60	11,3532	
50	12,4466	
0	16,3256	I

Apéndice 20. Resumen del análisis a *posteriori* de Duncan ($P < 0,05$) del contenido de carbohidratos de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Tiempo	Promedios	Grupos homogéneos
0	10,6568	
48	11,2307	
96	13,3609	I

Apéndice 21. Resumen del análisis de varianza del contenido de lípidos totales de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Radio F	Valor P
Aceites	174,587	1	3,99	0,0498
Concentración	1875,66	4	10,71	0,0000
Tiempo	6426,48	2	73,41	0,0000
Acei-Conc	9,0174	4	0,05	0,9949
Acei-Tiem	46,0292	2	0,53	0,5935
Conc-Tiem	1562,57	8	4,46	0,0002
Residuo	2976,38	68		
Total	13070,7	89		

$P < 0,05$ * significativo

Apéndice 22. Resumen del análisis a *posteriori* de Duncan ($P < 0,05$) del contenido de lípidos totales de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Aceites	Promedios	Grupos homogéneos
Usado	53,5265	I
No usado	50,7409	I

Apéndice 23. Resumen del análisis *a posteriori* de Duncan ($P < 0,05$) de las diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) que afecta el contenido de lípidos totales de *Tetraselmis* sp., a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Concentración	Promedios	Grupos homogéneos
80	60,5978	I
70	52,6443	I
60	50,3622	I
50	49,8013	I
0	47,263	I

Apéndice 24. Resumen del análisis *a posteriori* de Duncan ($P < 0,05$) del contenido de lípidos totales de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Tiempo	Promedios	Grupos homogéneos
0	42,1862	I
48	51,3721	I
96	62,8428	I

Apéndice 25. Resumen del análisis de varianza de la producción de energía de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Radio F	Valor P
Aceites	0,00000084	1	5,94	0,0174
Concentración	0,00000501	4	8,85	0,0000
Tiempo	0,00000902	2	31,83	0,0000
Acei-Conc	0,00000022	4	0,40	0,8110
Acei-Tiem	0,00000019	2	0,70	0,4988
Conc-Tiem	0,00000143	8	1,26	0,2771
Residuo	0,00000949	68		
Total	0,0000262	89		

P<0,05* significativo

Apéndice 26. Resumen del análisis *a posteriori* de Duncan (P<0,05) de la producción de energía de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Aceites	Promedios	Grupos homogéneos
Usado	0,0033	I
No usado	0,0035	I

Apéndice 27. Resumen del análisis *a posteriori* de Duncan (P<0,05) de las diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) que afecta la producción de energía de *Tetraselmis* sp., a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Concentración	Promedios	Grupos homogéneos
80	0,0034	
70	0,0032	
60	0,0031	
50	0,0034	
0	0,0038	

Apéndice 24. Resumen del análisis *a posteriori* de Duncan ($P < 0,05$) de la producción de energía de *Tetraselmis* sp., obtenida a diferentes concentraciones de la fracción acuosa del aceite automotriz (Usado y no usado) a las 0, 48 y 96 h de exposición.

Tiempo	Promedios	Grupos homogéneos
0	0,0031	I
48	0,0033	I
96	0,0038	I

Hoja de Metadatos

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	EFFECTOS DEL ACEITE AUTOMOTRIZ SOBRE PARÁMETROS POBLACIONALES, CONTENIDO DE PIGMENTOS Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LA MICROALGA <i>Tetraselmis</i> sp. (G1) DEL NORORIENTE DE VENEZUELA
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Ana Verónica Blanco Bruzual	CVLAC	14284403
	e-mail	anaveronicablanca@hotmail.com
	e-mail	anaveronica07@yahoo.es
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Tetraselmis, aceite de motor, microalga, crecimiento, Venezuela.</i>

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail				
LODEIROS CÉSAR	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input checked="" type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC				
	e-mail				
	e-mail				
	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC				
	e-mail				
	e-mail				
	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC				
	e-mail				
	e-mail				
	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC				
	e-mail				
	e-mail				

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2011	05	19
------	----	----

Lenguaje: spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS.doc	Application/word

Alcance:

Espacial : _____ **(Opcional)**

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciatura

Nivel Asociado con el Trabajo: LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

Área de Estudio:

BIOLOGÍA

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

Yo, Ana Blanco titular de la cedula de identidad 14670244 estudiante de licenciatura en biología autorizo a la Universidad de Orienta para la publicación de dicho trabajo de investigación.


Blanco Ana
AUTOR 1


ASESOR


JURADO 1


JURADO 2

POR LA COMISIÓN DE TESIS: