

**EVALUACIÓN POR ANÁLISIS DE IMAGEN DE LOS EFECTOS TÓXICOS DEL  
COBRE Y MERCURIO SOBRE LA BIOLUMINISCENCIA EN EL  
DINOFLAGELADO MARINO *Pyrocystis lunula***

**SAMUEL JOSUE BEDOYA DUQUE**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
MEDELLÍN  
2009**

**EVALUACIÓN POR ANÁLISIS DE IMAGEN DE LOS EFECTOS TÓXICOS DEL  
COBRE Y MERCURIO SOBRE LA BIOLUMINISCENCIA EN EL  
DINOFLAGELADO MARINO *Pyrocystis lunula***

**SAMUEL JOSUE BEDOYA DUQUE**

**Trabajo de grado presentado para optar al título de Biólogo.**

**Asesor de investigación:  
JAIME ALBERTO PALACIO BAENA  
Coordinador grupo de investigación GAIA**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
MEDELLÍN  
2009**

**Nota de aceptación:**

---

---

---

---

---

---

---

---

Firma del asesor

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

Medellín, 28 de septiembre de 2009

*A mi familia, con cariño y aprecio.*

## CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	13
1. MARCO TEÓRICO	15
1.1 DINOFLAGELADOS	15
1.2 BIOLUMINISCENCIA	16
1.3 <i>Pyrocystis lunula</i>	17
1.4 BIOENSAYOS Y CI <sub>50</sub>	19
1.5 PRUEBAS DE TOXICIDAD CON MICROORGANISMOS	20
1.5.1 Con bacterias	20
1.5.2 Con microalgas	21
1.5.3 Con dinoflagelados	21
1.6 CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS	23
1.6.1 Cobre	23
1.6.2 Mercurio	24
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	25
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	28
4.1 OBJETIVO GENERAL	28
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5. JUSTIFICACIÓN	29
6. METODOLOGÍA	30
6.1 CONDICIONES DE CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE <i>Pyrocystis lunula</i>	30
6.2 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL EQUIPO DE MEDICIÓN	31
6.3 PROGRAMACIÓN DEL SOFTWARE PARA ANÁLISIS DE IMAGEN	32
6.4 PRUEBAS DE CALIBRACIÓN	33
6.4.1 Registro fotográfico de la bioluminiscencia	33
6.4.2 Velocidad de agitación en microplatos	33
6.4.3 Homogeneidad de respuesta lumínica en microplatos	34
6.4.4 Relación entre intensidad lumínica y densidad celular	34
6.5 PRUEBAS DE TOXICIDAD	34
6.5.1 Procedimiento general	34
6.5.2 Soluciones <i>stock</i> y diluciones de contaminantes	34
6.6 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	35

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
7.1 ACLIMATACIÓN Y CULTIVO	36
7.2 PRUEBAS DE CALIBRACIÓN	37
7.2.1 Registro fotográfico de la bioluminiscencia	37
7.2.2 Velocidad de agitación en microplatos	38
7.2.3 Homogeneidad de respuesta lumínica en microplatos	38
7.2.4 Relación entre la intensidad lumínica y la densidad celular	42
7.3 PRUEBAS DE TOXICIDAD	46
7.3.1 Toxicidad del cobre	46
7.3.2 Toxicidad del mercurio	55
7.3.3 Comparación entre las pruebas de toxicidad con Cu y Hg tras 4 horas de exposición	60
7.3.4 Comparación de los resultados obtenidos con otras investigaciones de toxicidad del Cu y Hg en microorganismos bioluminiscentes	61
CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	65

## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Medio L1 para cultivo de microalgas marinas	31
Tabla 2. Condiciones experimentales de la exposición de <i>P. lunula</i> a Cu y Hg	35
Tabla 3. Configuración de parámetros para la cámara Powershot A590IS	37
Tabla 4. Distancia geométrica de la intensidad de bioluminiscencia de <i>P. lunula</i> en la prueba de homogeneidad lumínica	39
Tabla 5. Resumen estadístico de la prueba de homogeneidad lumínica	40
Tabla 6. Pruebas de normalidad para la prueba de homogeneidad lumínica	40
Tabla 7. Verificación de la varianza para la prueba de homogeneidad lumínica	40
Tabla 8. ANOVA para la prueba de homogeneidad lumínica	41
Tabla 9. Distancia geométrica de la intensidad lumínica de <i>P. lunula</i> a diferentes densidades celulares	43
Tabla 10. Promedio de la distancia geométrica de los 8 pozos de cada fila para las tres pruebas de densidad celular con <i>P. lunula</i>	43
Tabla 11. Resumen estadístico para las pruebas de densidad celular	45
Tabla 12. Prueba de Kruskal Wallis aplicada a las pruebas de densidad celular	45
Tabla 13. Distancia geométrica de la intensidad lumínica de <i>P. lunula</i> (fracción del control) sometida a Cu durante tres periodos de exposición	47
Tabla 14. Promedio de distancia geométrica (%) para cada concentración de Cu en las tres pruebas y en los tres periodos de exposición	47
Tabla 15. Resumen estadístico para pruebas de toxicidad con Cu	49
Tabla 16. Resultados de la prueba de Kruskal Wallis aplicada a los datos de inhibición de luminiscencia de <i>P. lunula</i> expuesta a Cu	50
Tabla 17. CI <sub>50</sub> del Cu (ppb) sobre <i>P. lunula</i> para tres pruebas por exposición	52
Tabla 18. CI <sub>50</sub> promedio del Cu (ppb) sobre <i>P. lunula</i> por periodo de exposición	53
Tabla 19. Pruebas de normalidad para las CI <sub>50</sub> del Cu sobre <i>P. lunula</i>	53
Tabla 20. Verificación de la varianza para las CI <sub>50</sub> del Cu sobre <i>P. lunula</i>	53
Tabla 21. ANOVA para las CI <sub>50</sub> del Cu sobre <i>P. lunula</i>	54
Tabla 22. Prueba de rangos múltiples para las CI <sub>50</sub> del Cu sobre <i>P. lunula</i>	54
Tabla 23. Distancia geométrica de la intensidad lumínica de <i>P. lunula</i> (fracción del control) sometida a Hg en tres pruebas independientes (4 h)	56
Tabla 24. Promedio de distancia geométrica (%) para cada concentración de Hg	56
Tabla 25. Resumen estadístico para pruebas de toxicidad con Hg (4 h)	58
Tabla 26. Resultados de la prueba de Kruskal Wallis aplicada a los datos de inhibición de luminiscencia de <i>P. lunula</i> expuesta a Hg (4 h)	58
Tabla 27. CI <sub>50</sub> promedio del Hg (ppb) sobre <i>P. lunula</i> luego de 4 horas de exposición.	59
Tabla 28. Promedio de distancia geométrica (%) de intensidad lumínica en <i>P. lunula</i> para cada concentración de Cu y Hg (μM) tras 4 horas de exposición	60
Tabla 29. CI <sub>50</sub> -4h promedio de Cu y Hg (μM) sobre <i>P. lunula</i>	60
Tabla 30. Comparación de las CI <sub>50</sub> (ppm) obtenidas en pruebas de toxicidad con Cu y Hg en microorganismos luminiscentes.	61

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Imagen por microscopía óptica de <i>Pyrocystis lunula</i>	18
Figura 2. Imagen por microscopía de fluorescencia de <i>P. lunula</i>	19
Figura 3. Tubo fotomultiplicador del equipo comercial Qwiklite®	22
Figura 4. Cultivos de <i>P. lunula</i> en la cámara de iluminación del grupo GAIA	30
Figura 5. Equipo de medición LumTox	32
Figura 6. Esquema del espacio de color RGB	33
Figura 7. Agitador de microplatos del equipo LumTox	33
Figura 8. Curva de crecimiento del primer cultivo de <i>P. lunula</i>	36
Figura 9. Células de <i>P. lunula</i> cultivadas en medio L1	37
Figura 10. Cultivo madre de <i>P. lunula</i> registrado fotográficamente en fase oscura	37
Figura 11. Registro fotográfico del comportamiento de la luminosidad de <i>P. lunula</i> en la prueba de homogeneidad lumínica	38
Figura 12. Dispersión de datos de la prueba de homogeneidad lumínica	39
Figura 13. Gráfica de medias para la prueba de homogeneidad lumínica	41
Figura 14. Gráfica de análisis medias para la prueba de homogeneidad lumínica	41
Figura 15. Registro fotográfico del comportamiento de la luminosidad de <i>P. lunula</i> a diferentes densidades celulares	42
Figura 16. Disminución lumínica en <i>P. lunula</i> para las pruebas de densidad celular	44
Figura 17. Dispersión de datos para las pruebas de densidad celular	44
Figura 18. Caja y bigotes para las pruebas de densidad celular	45
Figura 19. Registro fotográfico del comportamiento de la luminosidad de <i>P. lunula</i> tratada con Cu durante tres periodos de exposición	46
Figura 20. Inhibición lumínica en <i>P. lunula</i> tratada con Cu en tres pruebas y tres periodos de exposición	48
Figura 21. Dispersión de datos para las pruebas de toxicidad con Cu	49
Figura 22. Caja y bigotes para pruebas de toxicidad con Cu	50
Figura 23. Regresión entre [Cu] y la intensidad lumínica (%) de <i>P. lunula</i> (4 h)	51
Figura 24. Regresión entre [Cu] y la intensidad lumínica (%) de <i>P. lunula</i> (28 h)	51
Figura 25. Regresión entre [Cu] y la intensidad lumínica (%) de <i>P. lunula</i> (52 h)	52
Figura 26. Dispersión de los resultados de las CI <sub>50</sub> de Cu en <i>P. lunula</i>	53
Figura 27. Intervalos de confianza para los valores medios de las CI <sub>50</sub> de Cu sobre <i>P. lunula</i>	54
Figura 28. Registro fotográfico del comportamiento de la luminosidad de <i>P. lunula</i> tratada con Hg en tres pruebas independientes	55
Figura 29. Inhibición lumínica en <i>P. lunula</i> tratada con Hg en tres pruebas (4 h)	57
Figura 30. Dispersión de datos para pruebas de toxicidad con Hg (4 h)	57
Figura 31. Caja y bigotes para pruebas de toxicidad con Hg (4 horas)	58
Figura 32. Regresión entre [Hg] y la intensidad lumínica (%) de <i>P. lunula</i> (4 h)	59
Figura 33. Inhibición lumínica promedio en <i>P. lunula</i> para las pruebas de toxicidad con Cu y Hg tras 4 horas de exposición	60



## GLOSARIO

**AGUDO:** ocurre dentro de un periodo corto en relación con el periodo de vida del organismo de ensayo.

**ANÁLISIS DE IMAGEN:** es la extracción de información representativa derivada de imágenes digitales por medio de técnicas de procesamiento que transforman la imagen en datos cuantitativos. Mediante análisis de imagen se pueden realizar tareas tan diversas como la lectura de un código de barras o el reconocimiento facial de una persona.

**BIOENSAYO:** ensayo que permite determinar el efecto de una sustancia o mezcla sobre un grupo de organismos seleccionados bajo condiciones definidas. Mide las proporciones de organismos afectados o el grado de efecto luego de la exposición a la muestra.

**CCD:** un CCD (siglas en inglés de *charge-coupled device*) es uno de los elementos principales de las cámaras digitales. En éstas, el CCD es el sensor con diminutas celdas fotoeléctricas que registran la imagen. Desde allí la imagen es procesada por la cámara y registrada en la tarjeta de memoria. La capacidad de resolución de la imagen depende del número de celdas fotoeléctricas del CCD y se expresa en píxeles. Además, los píxeles del CCD registran los colores en el espacio de color RGB.

**CONTAMINANTE:** agente físico, químico o biológico, presente en lugares, formas y concentraciones tales y con tal duración que sean o puedan ser nocivos para la salud, la seguridad o bienestar de la población, o perjudiciales para la vida animal y vegetal.

**CONTROL NEGATIVO:** tratamiento que duplica todos los factores que puedan afectar el resultado, excepto la condición que está siendo investigada.

**CRÓNICO:** ocurre durante un periodo relativamente largo de exposición, es decir, durante una porción significativa de la vida del organismo (>10%).

**CI<sub>50</sub>** (concentración de inhibición media): concentración de la sustancia que afecta al 50% de los organismos de ensayo.

**CL<sub>50</sub>:** (concentración letal media): concentración de la sustancia que es letal para el 50% de los organismos de ensayo.

**ESPACIO DE COLOR RGB:** sistema coordinado tridimensional dentro del cual se definen los colores que pueden observarse en imágenes digitales. El espacio de color RGB tiene tres dimensiones que son rojo (*Red*), verde (*Green*) y azul (*Blue*), y un color por lo tanto es definido por tres coordenadas que representan su posición dentro de dicho espacio. Dado que las dimensiones de rojo, verde y azul pueden tomar cada una 256 valores distintos, la cantidad de colores que puede definir el modelo RGB es de  $256^3$ , es decir, 16.777.216 colores.

**MICROPLATO:** plato plano con múltiples cámaras de prueba, hecho de una variedad de materiales, de los cuales el más común es el poliestireno. Los microplatos se han convertido en una herramienta estándar en la investigación analítica. Un microplato puede tener 6, 24, 96, 384 e incluso 1536 recipientes de prueba independientes, también llamados pozos, organizados en una matriz rectangular. Cada pozo de microplato puede contener un volumen entre unos cuantos nanolitros hasta pocos mililitros.

**PUNTO FINAL:** medida o valor que expresa el resultado de un ensayo (CL<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>). Es la variable empleada para medir la respuesta del organismo.

**RÉPLICA:** es una cámara o recipiente de ensayo, conteniendo un número especificado de organismos en una concentración de muestra definida o de agua de dilución sin muestra como control. Cada réplica debe ser un recipiente independiente de ensayo.

**TOXICIDAD AGUDA:** efectos adversos (letales o subletales) inducidos sobre los organismos de ensayo durante un periodo corto de exposición al material.

**TOXICIDAD CRÓNICA:** efectos tóxicos inducidos sobre los organismos de ensayo durante un largo plazo de exposición al material.

## RESUMEN

La bioluminiscencia en los océanos es debida en gran parte a los dinoflagelados marinos. En estos organismos la bioluminiscencia ha mostrado estar regulada por un ciclo circadiano y ser estimulada por fuerzas mecánicas. *Pyrocystis lunula* es un dinoflagelado unicelular fotoautótrofo, comúnmente encontrado en ambientes marinos. Este estudio investiga la respuesta de la bioluminiscencia de *P. lunula* tras exposición aguda a metales en un ensayo de inhibición miniaturizado y de bajo costo usando microplatos de 96 pozos, la bioluminiscencia fue medida mediante el uso de una cámara CCD que obtuvo la señal bioluminiscente de los pozos para luego cuantificar la distancia geométrica de los píxeles en el espacio de color RGB usando análisis informático de imagen. La evaluación estadística fue realizada para determinar si la respuesta biolumínica de *P. lunula* en microplatos era adecuada para pruebas de toxicidad ambiental. La bioluminiscencia demostró una dependencia directa de la concentración de los dos metales ensayados, el sistema fue más sensible al Hg que al Cu (CI<sub>50</sub>4-h 0.57 y 6.43 μM, respectivamente). Los resultados muestran que el bioensayo en microplato de la inhibición de la bioluminiscencia como punto final en *P. lunula* es sensible para ambos metales y obtiene resultados reproducibles. En conclusión, esta prueba miniaturizada puede ser una buena herramienta a incluir en el monitoreo toxicológico de químicos y muestras ambientales, con la ventaja de requerir bajos volúmenes de muestra, permitir a un gran número de muestras ser probadas simultáneamente y generar bajos volúmenes de desechos.

*Palabras clave:* Bioensayo; Inhibición de la bioluminiscencia; Metales pesados; *Pyrocystis lunula*; Pruebas de toxicidad; Análisis de imagen

## ABSTRACT

Bioluminescence at the oceans is due in great part to marine dinoflagellates. In these organisms bioluminescence have shown to be regulated by a circadian rhythm and to be stimulated by mechanical stress. *Pyrocystis lunula* is a unicellular photoautotrophic dinoflagellate, commonly found in marine environments. This study investigates the response of the bioluminescence of *P. lunula* to acute exposure to metals in a miniaturized and inexpensive inhibition assay using 96-well microplates, the bioluminescence was measured with the use of a CCD camera that obtained the bioluminescent signal from the wells and then the pixels distance in the RGB color space was quantified using image analysis software. Statistical evaluation was conducted to determine if the bioluminescent response of *P. lunula* in microplates is suitable for environmental toxicity testing. Bioluminescence showed a direct dependence on dose for the two contaminants tested, the system was more sensitive to Hg than to Cu (4-h IC<sub>50</sub> 0.57 and 6.43  $\mu$ M, respectively). The results show that the microplate bioassay with inhibition of bioluminescence as the endpoint in *P. lunula* is sensitive to both metals tested and obtains reproducible results. In conclusion, this miniaturized test can be a good tool to include in toxicity screening of chemicals and environmental samples, with the advantage of requiring low sample volumes, allowing large numbers of samples to be tested simultaneously, and generating low volumes of waste.

*Key words:* Bioassay; Bioluminescence inhibition; Heavy metals; *Pyrocystis lunula*; Toxicity testing; Image analysis

## INTRODUCCIÓN

El fitoplancton constituye el primer eslabón de la cadena trófica en los ecosistemas acuáticos, representa una fuente de alimentación directa o indirecta para las poblaciones herbívoras del zooplancton y otros animales. En consecuencia, si alteran la composición y la estructura de la comunidad de microalgas, como resultado de algún factor de estrés ambiental, se modifica la función del sistema (Yap et al., 2004). Los ambientes acuáticos son muy vulnerables al ingreso de sustancias contaminantes y cuando las concentraciones de estas se incrementan generan estrés fisiológico sobre los organismos. Dentro de los tóxicos más preocupantes en el medio acuático están los metales pesados, cuya principal fuente son las actividades industriales como minería, fundición y refinería. La presencia de estas sustancias en el agua es causa de creciente preocupación a nivel mundial. Los metales pesados inhiben el crecimiento y producen cambios morfológicos y fisiológicos en las poblaciones de microalgas (Cordero et al., 2005; Satoh et al., 2005; Debelius et al., 2009).

La ecotoxicología, desarrollada a partir de la toxicología y la química medioambiental, es el estudio del destino y efecto de agentes tóxicos en los ecosistemas, incluyendo los niveles celular, individual, poblacional y comunitario. Los ensayos ecotoxicológicos se utilizan con el fin de obtener información de los efectos y mecanismos de acción de diversas sustancias químicas (Castillo, 2004). Además, estos ensayos son empleados para la detección temprana, control y monitoreo de la presencia de contaminantes en el agua, suelos y sedimentos.

Los ensayos de toxicidad han probado ser un mecanismo confiable para vigilar las concentraciones ambientales de diferentes metales pesados. Dichos ensayos utilizan organismos representativos, especialmente acuáticos, como anfibios, peces, macroinvertebrados y microcrustáceos (Castillo, 2004). Sin embargo, las pruebas de toxicidad con estos organismos son dispendiosas por los tiempos prolongados de exposición, las grandes demandas de espacio, metodologías de evaluación dispendiosas y elevado costo. Los ensayos con microorganismos tienen algunas ventajas debido a que presentan rutas bioquímicas similares a las de los organismos superiores, ciclos de vida cortos, facilidad de cultivo y responden rápidamente a cambios en el ambiente (Hsieh et al., 2004; Rosen et al., 2008). Por tanto, las pruebas son menos demandantes de tiempo y espacio y requieren poca inversión.

Investigaciones recientes han validado la metodología de ensayos de toxicidad y han demostrado la importancia de las microalgas como organismos estándar (ASTM, 2004; Gómez et al., 2004; Debelius et al., 2009). No obstante, las pruebas de toxicidad con estos microorganismos han enfatizado en el efecto de los contaminantes sobre el crecimiento o la morfología, lo que implica conteos y seguimientos celulares que pueden ser dispendiosos y requieren un buen conocimiento de la morfología del organismo.

Las algas dinoflageladas luminiscentes han sido evaluadas exitosamente como bioindicadores en estudios de toxicidad, en los cuales la estimación del efecto se cuantifica en función del proceso fisiológico de bioluminiscencia (Robayo, 1999; Okamoto et al.,

1999; Heimann et al., 2002; Craig et al., 2003; Lapota et al., 2007). Este procedimiento ha demostrado ser más rápido y las respuestas presentan una buena correlación con las estimaciones tradicionales en otros organismos (Rosen et al., 2008). No obstante, el costoso equipo fotomultiplicador para medir la intensidad lumínica de las algas es el principal limitante para la transferencia de esta tecnología a países en desarrollo.

El presente estudio pretende validar el uso del análisis informático de imagen para la medición de la respuesta lumínica en un dinoflagelado bioluminiscente, a fin de simplificar el equipo para obtener un método cuantitativo y con potencial aplicación en la detección de contaminantes. Adicionalmente, se busca implementar técnicas de experiencias exitosas en la miniaturización de bioensayos con microorganismos a escala de microplato (Eisentraeger et al., 2003; Gabrielson et al., 2003; Hirmann et al., 2007; Paixao et al., 2008), para reducir costos, tiempos de medición y volúmenes de ensayo. De esta forma, se pretende, maximizar la capacidad de medición simultánea de varias unidades experimentales.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 DINOFLAGELADOS

Los dinoflagelados son un amplio grupo de algas unicelulares que se encuentran principalmente en ambientes marinos y que se distribuyen en función de la temperatura, la salinidad y la profundidad. Dado que aproximadamente la mitad de los dinoflagelados son productores primarios, constituyen un elemento importante de la cadena alimenticia acuática. Otro grupo numeroso de dinoflagelados son heterótrofos obligados, pudiendo ser fagótrofos o parásitos. Algunos dinoflagelados viven en forma simbiótica con protistas e invertebrados marinos, estos endosimbiontes son fundamentales para la formación y el funcionamiento de los arrecifes de coral (Robayo, 1999).

Los dinoflagelados son considerados el grupo más primitivo de eucariotas, datan del precámbrico tardío, combinan caracteres de procariotas y de eucariotas. La teoría más aceptada de su origen sostiene que estos organismos derivan de formas heterotróficas que adquirieron sus plastidios a través de endosimbiosis secundaria y terciaria con diversos linajes evolutivos. Los análisis filogenéticos moleculares sitúan a los dinoflagelados con los ciliados y los apicomplejos, formando un grupo denominado alveolados (Hackett et al., 2004).

El rasgo más característico de los dinoflagelados es la presencia de un surco transversal (cíngulo) y otro longitudinal (sulco), de cada uno de los cuales se origina un flagelo, que les proporcionan sus movimientos característicos. El flagelo longitudinal funciona principalmente como timón, aunque también produce una cierta fuerza propulsora (Robayo, 1999). El flagelo transversal proporciona la mayor parte de la fuerza que propulsa la célula e imparte a menudo un movimiento giratorio distintivo, de donde procede el nombre dinoflagelados.

Debido a que el tamaño de los dinoflagelados fluctúa entre 20 y 500  $\mu\text{m}$ , son considerados dentro del micro y del macroplankton. Los dinoflagelados tienen un núcleo de gran tamaño, denominado dinocarion, que presenta un nucléolo prominente y cromosomas permanentemente condensados, sin histonas y fijos a la membrana nuclear. Los pigmentos confieren a las células una coloración pardoverdosa. Normalmente existen dos o más cloroplastos discoidales. Las especies fotosintetizadoras carecen de clorofila b pero poseen clorofila a y c, así como también un número de pigmentos carotenoides como el  $\beta$ -caroteno, además, un cierto número de xantofilas como peridina y dinoxantina (Hackett et al., 2004).

La célula puede ser desnuda y provista de un periplasto consistente (anfiesma) o estar rodeada por una pared celulósica (teca). Los dinoflagelados se suelen dividir en tecados (formas blindadas) o atecados (formas desnudas). Por convención la estructura celular de los tecados se divide en dos regiones, una superior (epiteca) y una inferior (hipoteca), separadas por el cíngulo que aloja al flagelo transversal; Adicionalmente, en la región ventral de la hipoteca se encuentra el sulco que aloja al flagelo longitudinal. Las placas de naturaleza celulósica que forman parte de la pared de estos organismos, son consideradas

como la característica taxonómica más importante, ya que su forma, número y posición es propia de cada especie. Además las características del cíngulo y su ubicación varían entre especies, por lo que también se utilizan como criterio taxonómico.

Los dinoflagelados se reproducen principalmente por división asexual. Cada célula hereda uno de los flagelos y diferencia pronto el que le falta. En algunos géneros como *Pyrocystis*, ocurre una serie de divisiones múltiples dentro del cisto primario y se producen 4, 8 o 16 cistos secundarios (Robayo, 1999). Las células pueden enquistarse, formar membranas gruesas y acumular abundantes reservas con lo cual se hacen resistentes a las condiciones ambientales extremas (Hackett et al., 2004).

Gracias a las características morfológicas y a los requerimientos nutritivos, los dinoflagelados han logrado ser exitosos en aguas tropicales. Estas microalgas proliferan en lugares protegidos, en situaciones meteorológicas adecuadas y con suficiente aporte de nutrientes, provocan coloraciones verdosa, pardo-verdosa o roja en el agua. El cambio en la coloración del agua es conocido como marea roja o hemotaliasia y se debe a un aumento de géneros como *Glenodinium*, *Gymnodinium* y *Gonyaulax*. Estas mareas rojas están asociadas con la producción de una serie de potentes toxinas citolíticas, hepatotóxicas y neurotóxicas.

## 1.2 BIOLUMINISCENCIA

La bioluminiscencia es la habilidad de ciertos seres vivos para producir luz, como resultado de la siguiente reacción de oxidación:



Mediante esta reacción exergónica un compuesto orgánico, que suele ser diferente para cada especie y que se denomina genéricamente luciferina, es oxidado con la participación de una luciferasa diferente en cada especie. La luciferina se transforma en oxiluciferina, un compuesto inestable que se estabiliza emitiendo un fotón. La secuencia de aminoácidos de la luciferasa o la presencia de proteínas accesorias determinan el color de las emisiones (Wilson et al., 1998).

La bioluminiscencia ha despertado gran interés, en especial porque ocurre en grupos muy diversos desde bacterias hasta peces. Además, se sabe que ha evolucionado independientemente en estos organismos, ya que los genes que codifican para las luciferasas no muestran homología entre sí y las luciferinas no están relacionadas químicamente. Entre las hipótesis más aceptadas sobre el significado de la bioluminiscencia para los organismos, se encuentran la eliminación del exceso de oxígeno (bacterias bioluminiscentes), atracción y captura de presas, disuasión de depredadores (dinoflagelados) y comunicación entre individuos de la misma especie (Wilson et al., 1998).

Aunque numerosos organismos marinos emiten luz, los dinoflagelados son los únicos fotosintéticos que presentan esta característica. Es ampliamente aceptado que los dinoflagelados representan una gran proporción de la bioluminiscencia de los océanos y al



igual que la mayoría de organismos marinos bioluminiscentes, emiten luz con un pico en la longitud de onda cercano a los 490 nm (la longitud que mejor se trasmite en aguas oceánicas) (Robayo, 1999). Dado que no todos los dinoflagelados son bioluminiscentes, la bioluminiscencia en este grupo puede considerarse una estrategia de supervivencia útil pero no esencial (Hackett et al., 2004).

En los dinoflagelados la bioluminiscencia es emitida desde numerosas organelas pequeñas (aprox. 400/célula), llamadas centellones de cerca de 0,4  $\mu\text{m}$  de diámetro. La luciferasa y la luciferina están localizadas en los centellones, los cuales permanecen en intimo contacto con la membrana vacuolar, permitiendo la conducción de los potenciales de acción que se cree abren los canales de protones. Este hecho acidifica transitoriamente los centellones con la consecuente exposición de los sitios activos en la luciferasa para la oxidación de la luciferina (Dunlap et al., 1981). La mayoría de los dinoflagelados producen mucha menos bioluminiscencia durante el día, debido a que este proceso está controlado por un ritmo circadiano y alcanza la máxima intensidad entre las 4 y 8 horas después de iniciada la fase oscura (Knaust et al., 1998).

En la naturaleza la principal causa de bioluminiscencia es la estimulación mecánica por el movimiento del agua o de los peces, la estela de un barco o el rompimiento de una ola. Estas fuerzas deforman la membrana celular y se inicia un potencial de acción que produce un destello de unos 100 ms (Cussatlegras et al., 2005). Si el estímulo es constante, se puede presentar un resplandor continuo hasta que la célula agota sus reservas de luciferina (Wilson et al., 1998). Otra forma de estimulación usada en laboratorio, sola o en combinación con la mecánica, es la reducción del pH del entorno mediante una solución ácida, obteniéndose un resplandor continuo producto de la activación de la luciferasa a bajo pH (Swift et al., 1976).

Se han identificado aproximadamente 90 especies de dinoflagelados bioluminiscentes. Entre estas se encuentran *Noctiluca scintillans*, *Pyrocystis noctiluca*, *P. fusiformis*, *P. lunula*, *Gonyaulax polyedra*, *Pyrodinium bahamense*, *Ceratium furca* y *Ceratocorys horrida*. De éstas, las seis últimas se han reportado para el Caribe Colombiano (Silva, 1992; Robayo, 1999).

### **1.3 *Pyrocystis lunula***

Sinonimias: *Gymnodinium lunula* y *Dissodinium lunula*.

La ubicación taxonómica de esta especie es la siguiente:

**Reino:** Protozoa

**División:** Dinophyta

**Clase:** Dinophyceae

**Orden:** Pyrocystales

**Familia:** Pyrocystaceae

**Género:** *Pyrocystis*

Descripción: Célula atecada, grande de longitud máxima de 190  $\mu\text{m}$ , arqueada, en forma de medialuna, transparente, con núcleo oscuro central muy notorio. El ciclo de vida incluye dos estadios de cisto sucesivos que conducen a la formación del dinosporo. El cisto primario es una vejiga esférica sin pigmentos, con un diámetro entre 60 y 130  $\mu\text{m}$ , en la cual el citoplasma es periférico, contiene pocos plastidios y una gran vacuola central. Este cisto se divide internamente para dar 4, 8 o 16 cistos secundarios en forma de medialuna, los cuales son liberados (Robayo, 1999).

El estado de cisto secundario, en forma de medialuna y sin flagelos, se encuentra mayoritariamente en el plancton y tiene un diámetro entre 100 y 190  $\mu\text{m}$ . En este cisto el protoplasma se retracta de la pared celular en el ápice y se divide de una hilera de 2 a 16 dinosporas desnudas, las cuales son biflageladas. Estas pueden contener cloroplastos y sus flagelos se ven retraídos antes de liberarse (Hackett et al., 2004).

Esta especie exhibe una intensa luminiscencia, no produce toxinas ni ha sido asociada con las proliferaciones algales nocivas y es típica de aguas tropicales, principalmente en la costa norte de Brasil, Mar Caribe y Estrecho de la Florida (Robayo, 1999).



UTEX LB #2271  
*Pyrocystis lunula*  
Cepario de la Universidad de Texas. <http://www.utex.org>

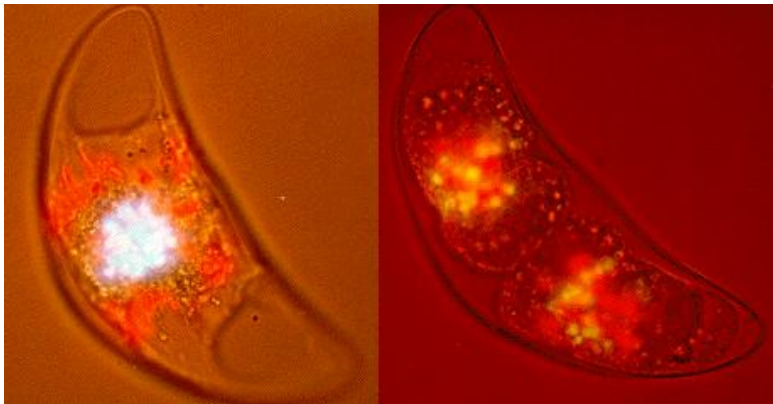
**Figura 1. Imagen por microscopía óptica de *Pyrocystis lunula*.**

*Pyrocystis lunula* es una de las dinofíceas más estudiadas para dilucidar los mecanismos involucrados en el control de la bioluminiscencia en los niveles circadiano, celular y molecular. (Swift et al., 1973; 1976; Dunlap et al., 1981; Knaust et al., 1998). La estructura de la luciferina propia de los dinoflagelados fue determinada en *P. lunula*, se trata de un tetrapirrol lineal derivado de la clorofila, muy sensible a la auto-oxidación, y que no muestra similitud con ninguna otra luciferina (Dunlap et al., 1981).

Algunos dinoflagelados poseen una proteína accesoria además de la luciferasa, la proteína de unión a la luciferina (*Luciferin binding protein* LBP), encargada de mediar la disponibilidad de luciferina de acuerdo al pH. Por su parte, *Pyrocystis lunula* sólo presenta la luciferasa (Knaust et al., 1998). Sin embargo, esta enzima muestra reactividad con las luciferinas aisladas de diferentes dinoflagelados. Además, sus genes no tienen intrones,

están presentes en muchas copias en su genoma, y no muestran homología con los genes de luciferasas de otros organismos (Wilson et al., 1998).

Los dinoflagelados bioluminiscentes muestran un control circadiano de la luminiscencia. Por ejemplo, en *Gonyaulax polyedra*, la luciferasa, la LBP e incluso los propios centellones son destruidos al final de la fase oscura y luego son sintetizados nuevamente en la fase lumínica (Wilson et al., 1998). Por su parte, en *Pyrocystis lunula*, la cantidad de luciferasa permanece constante durante todo el fotoperiodo y al parecer lo que cambia en este caso es su localización celular (Swift et al., 1967; Knaust et al., 1998).



<http://golgi.harvard.edu/hastings/Images/pyrocystis.gif>

**Figura 2. Imagen por microscopía de fluorescencia del control circadiano en *P. lunula*. Fase oscura, izquierda. Fase lumínica, derecha. (Blanco = luminiscencia)**

#### **1.4 BIOENSAYOS Y CI<sub>50</sub>**

Los ensayos biológicos son herramientas adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre los organismos de prueba bajo condiciones experimentales controladas. Estos efectos pueden ser evaluados por la muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos en los organismos. Los efectos se pueden manifestar a nivel de estructuras subcelulares o sistemas enzimáticos, organismos, poblaciones y hasta comunidades. La toxicidad de una sustancia depende de las propiedades químicas y de la concentración, de la duración y frecuencia de la exposición al tóxico y de su relación con el ciclo de vida del organismo (Castillo, 2004).

Los criterios de selección de especies bioindicadoras para pruebas de toxicidad se fundamentan en los siguientes aspectos:

- Alta y constante sensibilidad a tóxicos.
- Alta disponibilidad y abundancia en la naturaleza.
- Estabilidad genética y uniformidad en las poblaciones.
- Representatividad de su nivel trófico.
- Significado ambiental en relación con el área de estudio.
- Amplia distribución e importancia comercial.
- Facilidad de cultivo y adaptabilidad a las condiciones de laboratorio.

El desarrollo de ensayos de toxicidad implica la adopción de algunos supuestos, que no siempre se cumplen y que limitan el espectro de aplicabilidad de los resultados. Entre estos se encuentran:

- La sensibilidad de las especies y de los individuos de una misma especie en condiciones de confinamiento es la misma que en el ambiente natural.
- La variabilidad de especies de la misma familia es menor que entre especies distantes desde el punto de vista taxonómico.
- Las concentraciones ensayadas en el laboratorio son cuantitativa y cualitativamente representativas del estado o reactividad de la sustancia en el ambiente natural.

El efecto tóxico sobre los sistemas biológicos se debe a la acción combinada de todas las sustancias nocivas presentes en el agua, incluso de las no tóxicas, que afectan las propiedades químicas o físicas del sistema. Es importante considerar las sustancias que agotan el oxígeno o que impiden la propagación de la luz. También se deben tener en cuenta los efectos no directamente relacionados con sustancias, como el daño producido por cambios en la temperatura o la iluminación (Robayo, 1999).

A pesar del limitado poder de extrapolación de la información proveniente de ensayos de toxicidad bajo condiciones controladas y estandarizadas, estos estudios siguen siendo las fuentes de información predominantes en la evaluación ecológica de los efectos de tóxicos, por su costo y tiempo de ejecución relativamente bajos y porque proporcionan resultados prácticos. En consecuencia, los resultados de estos estudios son las principales herramientas de predicción temprana, para definir umbrales permisibles con niveles de incertidumbre aceptables, que sirven de guía a las entidades reguladoras.

## **1.5 PRUEBAS DE TOXICIDAD CON MICROORGANISMOS**

Cuando se emplean organismos superiores en las pruebas, la duración y la complejidad experimental hacen prácticamente imposible la evaluación de un elevado número de compuestos en tiempo y costo razonables. Las alternativas más promisorias contemplan la utilización de pocos organismos con alta sensibilidad, facilidad de cultivo y no protegidos por la legislación, como las bacterias y microalgas. De este modo, se han desarrollado pruebas de toxicidad utilizando microorganismos, en los que se puede valorar la respuesta de una población numerosa de individuos de forma rápida, sencilla y a bajo costo.

**1.5.1 Con bacterias.** El ensayo de toxicidad más utilizado es el que emplea la bacteria marina luminiscente y no patógena *Vibrio fischeri*. Esta es una bacteria gram negativa, anaerobia facultativa, de la familia Vibrionaceae cuya característica más representativa es la producción de bioluminiscencia como mecanismo de liberación de energía dentro de su metabolismo normal (Hsieh et al., 2004).

La reacción de bioluminiscencia bacteriana está ligada al sistema de transporte de electrones en la respiración celular y es indicativa del estado metabólico de la célula y en consecuencia, la disminución de la bioluminiscencia indica reducción del metabolismo celular. Los contaminantes afectan la respiración celular, alteran la síntesis de proteínas y

lípidos y modifican por tanto, el nivel de emisión de luminiscencia. En presencia de agentes contaminantes, la bioluminiscencia natural de *V. fischeri* disminuye y la toxicidad se expresa como concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>), es decir, concentración del agente contaminante que produce una reducción del 50% en la emisión de luz inicial.

Durante los últimos años se ha utilizado un procedimiento conocido comercialmente como Microtox® para evaluar la toxicidad de sustancias químicas. El ensayo Microtox® es ampliamente empleado por su sensibilidad, reproducibilidad y fácil aplicación para contaminantes orgánicos e inorgánicos. Además resulta más rápido (toxicidad aguda en 20 min.) que otros ensayos. Aunque para muchos compuestos y muestras los datos del Microtox® presentan buena correspondencia con los resultados de ensayos estándar de toxicidad aguda, estudios recientes han demostrado que existen diferencias en la sensibilidad a contaminantes ambientales entre procariotas y eucariotas (Heimann et al., 2002); (Lapota et al., 2007). El elevado costo del equipo y de los kits de prueba, le restan aplicabilidad al Microtox® en la mayoría de estudios de toxicidad en nuestro medio.

**1.5.2 Con microalgas.** Entre los indicadores de alerta temprana de los efectos de sustancias tóxicas en los ecosistemas acuáticos, el fitoplancton es tal vez el más promisorio, debido a sus necesidades nutricionales, su posición en la base de las cadenas tróficas y su capacidad de responder en forma rápida y previsible a un amplio espectro de agentes contaminantes. Tradicionalmente los ensayos con algas se han utilizado para evaluar la disponibilidad de nutrientes en ambientes acuáticos. De manera general, estos ensayos pueden usarse para determinar el estado de eutrofización, la limitación de nutrientes y los efectos tóxicos de efluentes (Gómez et al., 2004).

Las microalgas, en su condición de productores primarios, son consideradas indicadores primarios de contaminación. Cuando las microalgas se exponen a muestras contaminadas con tóxicos, se altera la tasa de crecimiento de la población. La inhibición del crecimiento luego de 48 a 96 horas de exposición a un tóxico bajo condiciones controladas, se determina por comparación con el crecimiento observado en un sistema libre de agentes contaminantes. Dependiendo del número de concentraciones y réplicas en el experimento, se determina la concentración media de inhibición de crecimiento o CI<sub>50</sub> (Castillo, 2004).

*Selenastrum*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Chaetoceros*, *Isochrysis*, *Tetraselmis* y *Dunaliella* están entre los géneros de algas unicelulares más ampliamente usados como organismos estándares para ensayos de toxicidad (Castillo, 2004; Yap et al., 2004; Satoh et al., 2005; Levy et al., 2007; Debelius et al., 2009).

**1.5.3 Con dinoflagelados.** Dado que las pruebas típicas de toxicidad con microalgas han enfatizado en el efecto de los contaminantes sobre el crecimiento y los conteos celulares pueden ser dispendiosos, se ha propuesto como alternativa el efecto sobre la bioluminiscencia en las algas dinoflageladas marinas. La gran sensibilidad demostrada por los dinoflagelados frente a factores abióticos, indica que pueden considerarse como buenos indicadores biológicos, ya que los organismos capaces de manifestar algún cambio detectable como respuesta metabólica ante alguna sustancia tóxica, pueden denominarse especies bioindicadoras (Lapota et al., 1993; Rosen et al., 2008).

En el tema de los dinoflagelados como indicadores biológicos, es importante resaltar los trabajos de Mendiola et al. (1982), Lapota et al. (1993), Saetre et al. (1997), Vinebrooke y Leavitt (1999), Dale (2001), Morquecho et al. (2004), Niemi et al. (2004), Radi et al. (2007), entre otros. A nivel nacional, los dinoflagelados como bioindicadores de cambios en masas de agua han sido estudiados por Castillo (1992), Silva (1992), Peña y Pinilla (2002), Torres (2004) y Ramírez et al. (2006).

El estudio de los dinoflagelados bioluminiscentes como indicadores de toxicidad en laboratorio se ha centrado en *P. lunula* y *G. polyedra* y ha sido desarrollado por autores como Lapota et al. (1993, 2007); Okamoto et al. (1999); Heimann et al. (2002); Craig et al. (2003); Rosen et al. (2008). En Colombia, Robayo (1999) hace una exploración sobre el potencial de cuatro especies de dinoflagelados bioluminiscentes como bioindicadores en pruebas de toxicidad.

Cuando los dinoflagelados son expuestos a contaminantes tóxicos, la bioluminiscencia se afecta mediante una relación típica de dosis-respuesta. Este hecho ha permitido usar la bioluminiscencia como punto final y calcular la concentración media de inhibición de bioluminiscencia ( $CI_{50}$ ), determinando la disminución en la luminiscencia por la exposición a agentes tóxicos en comparación con la luminiscencia normal en un sistema libre de contaminantes. Dicha determinación se ha realizado convencionalmente al medir como variable respuesta la intensidad lumínica mediante conteo de fotones en un tubo fotomultiplicador. Recientemente, se han desarrollado comercialmente pruebas de toxicidad con dinoflagelados bioluminiscentes (Figura 3), usando principalmente *G. polyedra* (Qwiklite®) y *Pyrocystis lunula* (Tox-Box®). Así mismo, existe una guía estándar para conducir pruebas de toxicidad con estas microalgas (ASTM, 1997).



<http://www.spawar.navy.mil/sti/publications/pubs/td/2688/>

**Figura 3. Tubo fotomultiplicador del equipo comercial Qwiklite®**

Dado el elevado costo de un tubo fotomultiplicador, existe una limitación para adelantar estas pruebas en países en desarrollo. Sin embargo, Robayo (1999) demostró que en lugar de medir la intensidad lumínica en fotomultiplicador como variable de respuesta, se podría cuantificar la duración de la emisión de luminiscencia (a una estimulación mecánica constante) con correlaciones mayores al 85% con respecto al método convencional.

## 1.6 CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS

Se consideran metales pesados a aquellos elementos cuya densidad es por lo menos cinco veces mayor que la del agua o cuyo número atómico es superior a 20 y que poseen un peso atómico comprendido entre 63.55 (Cu) y 200.59 (Hg). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0,1% y casi siempre menor del 0,01%. Además no son degradables y tienden a bioacumularse. Dentro de los metales pesados se pueden separar dos grupos de acuerdo a su función biológica:

- Micronutrientes requeridos en cantidades traza por plantas y animales para completar su ciclo vital. Forman parte de sistemas enzimáticos de modo que su ausencia causa enfermedades, pero pasado cierto umbral se vuelven tóxicos (Cu, Mo, Mn, Se y Zn).
- Metales sin función biológica conocida y cuya presencia en el ambiente conlleva disfunciones fisiológicas en seres vivos y adicionalmente se pueden bioacumular. La toxicidad de estas sustancias se debe a su capacidad de combinarse con una gran variedad de moléculas orgánicas, pero la reactividad es diferente y consecuentemente su acción tóxica (Cd, Hg, Ni y Pb).

**1.6.1 Cobre.** El Cu es uno de los metales más importantes para el hombre, su uso en aleaciones de bronce data desde 2000 a. C. Se utiliza fundamentalmente en la industria eléctrica, en la fabricación de cables y aparatos eléctricos, así como en aleaciones de latón y bronce. Debido a su alta conductividad térmica y a su relativo carácter inerte, se usa en la fabricación de utensilios de cocina, radiadores y en sistemas de conducción de agua. Forma parte de fertilizantes, bactericidas y fungicidas para agricultura así como de alguicidas empleados en la depuración de agua (Levy et al., 2007).

El cobre es un elemento traza esencial para la vida. Dado que el Cu puede adoptar distintos estados de oxidación juega un papel fundamental en la fisiología celular como cofactor de enzimas involucradas en un amplio espectro de actividades biológicas, tales como la respiración celular, la absorción de hierro, la formación del colágeno y elastina y la eliminación de radicales libres. A pesar de ser un metal esencial, es más tóxico que otros no esenciales como níquel y cadmio (Debelius et al., 2009). Dependiendo de la especie, el Cu puede producir considerables alteraciones fisiológicas e histopatológicas. Además, la exposición crónica puede llevar a su bioacumulación, con posibles efectos tóxicos. Afortunadamente, se ha demostrado que el Cu, no se biomagnifica en la cadena trófica. El límite admitido por la USEPA para el agua potable es de 1,3 ppm, mientras que su concentración media en aguas naturales es de 4 a 10 ppb.

La toxicidad del Cu sobre microalgas involucra principalmente inhibición de crecimiento. Sin embargo, la sensibilidad de las microalgas al Cu se extiende por varios órdenes de magnitud, de modo que se encuentran reportes de  $CI_{50}$  (entre 48 y 96 horas de exposición) que fluctúan desde 1 ppb hasta 100 ppm (Ismail et al., 2002; Yap et al., 2004; Satoh et al., 2005; Millán de Kuhn et al., 2006; Levy et al., 2007; Debelius et al., 2009).

La toxicidad del Cu también ha sido evaluada mediante ensayos de inhibición de luminiscencia con las especies de dinoflagelados *Gonyaulax polyedra*, *Pyrocystis lunula*, *Pyrocystis noctiluca*, *Ceratocorys horrida* (Lapota et al., 1993, 2007; Okamoto et al., 1999; Heimann et al., 2002; Craig et al., 2003; Rosen et al., 2008). En estas investigaciones, la inhibición lumínica se estableció utilizando equipos comerciales para conteo de fotones. Los valores de las  $CI_{50}$  reportadas para este metal, luego de hasta 24 horas de exposición, están en el rango de 21 a 185 ppb, ubicándose entre las especies más sensibles al cobre.

**1.6.2 Mercurio.** El Hg es un metal líquido, relativamente inerte ante el oxígeno o ácidos, en forma líquida, es volátil entre 20 y 25°C y soluble en líquidos polares y no polares. El Hg es poco abundante en la corteza terrestre, su concentración natural es 0,08 ppm, especialmente en forma de cinabrio ( $S_2Hg$ ) y su producción anual mundial alcanza 6.500 toneladas (Gaona, 2004).

Para la humanidad, el Hg ha sido un elemento muy importante, puesto que posee características especiales que le permiten ser materia prima para muchos procesos industriales. No obstante, el uso industrial ha llevado a la alteración del ciclo normal y al incremento de las concentraciones en ambientes naturales (Doadrio, 2004). La fuente natural de contaminación por Hg más importante es la sublimación del propio metal, creando un ciclo atmosférico como vía de entrada a las cadenas tróficas. Sin embargo, las especies de Hg presentes en la atmósfera, son inorgánicas y por tanto, de menor toxicidad.

Las más importantes fuentes antropogénicas de Hg son los residuos generados en la extracción de oro y en diferentes tipos de industrias. Además, es fuente importante su utilización como fungicida, herbicida o conservante de semillas en agricultura. El Hg no tiene ninguna función bioquímica, ni nutritiva y los mecanismos para su eliminación son deficientes. En bajas concentraciones, el Hg es sumamente tóxico para animales y para plantas. El aspecto más importante de la contaminación por Hg lo constituyen sus transformaciones en los sedimentos acuáticos. Se sabe que las formas inorgánicas de Hg son metiladas a metil o dimetil mercurio por bacterias sulforeductoras en los sedimentos. Las formas metiladas son más tóxicas que las especies inorgánicas, ya que son liposolubles y atraviesan fácilmente las membranas celulares e ingresan en la cadena alimentaria acuática (Doadrio, 2004).

Los efectos tóxicos del Hg han sido estudiados en microalgas, mediante las alteraciones que el metal produce en la tasa de crecimiento de estos microorganismos luego de exposiciones superiores a 48 horas. Es así como se han reportado  $CI_{50}$  entre 5 y 1140 ppb (Okamoto et al., 1999; Cordero et al., 2005; Horvatic y Persic, 2007).

En el caso particular de pruebas de toxicidad con dinoflagelados bioluminiscentes, existen reportes de ensayos con Hg en las especies *Gonyaulax polyedra*, *Ceratocorys horrida* y *Pyrocystis noctiluca* (Okamoto et al., 1999; Rosen et al., 2008). En estos estudios los valores de las  $CI_{50}$  reportadas para este metal, luego de 24 y 48 horas de exposición, están en el rango de 5 a 21 ppb, por lo que se ubican entre las especies más sensibles a la presencia de Hg en el medio acuático.



## 2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Aunque tradicionalmente la muerte y la inhibición del crecimiento han sido empleados como puntos finales en los ensayos de toxicidad, es posible evaluar los efectos sobre los procesos fisiológicos mediante una relación típica dosis-respuesta. Dado que la intensidad de la bioluminiscencia en las algas dinoflageladas marinas presenta tal relación, se ha sustentado su uso como punto final en ensayos que buscan establecer la concentración de inhibición media de bioluminiscencia ( $CI_{50}$ ).

La teoría más aceptada para explicar los mecanismos celulares que subyacen la inhibición de luminiscencia en dinoflagelados tras contaminación por metales pesados, sostiene que estos acidifican el citosol, debido a alteraciones en la permeabilidad de la membrana y al incremento de los potenciales de acción, lo que expondría los sitios activos de la luciferasa y evitaría la acumulación de la luciferina. Otra teoría sugiere que los metales y ciertos compuestos orgánicos dañan el DNA y que la disminución en la intensidad de la bioluminiscencia es solo un reflejo de los efectos genotóxicos que alteran el conjunto de las funciones celulares.

La reducción en la bioluminiscencia de los dinoflagelados con la exposición a sustancias tóxicas, se ha cuantificado mediante el conteo de fotones en un tubo fotomultiplicador. El estudio de Robayo (1999) propuso que en lugar de cuantificar la intensidad lumínica, se midiera la duración de la emisión de luminiscencia, Los resultados para Cu, Cr y Ba dieron correlaciones mayores al 85% con respecto al método convencional. El método de Robayo tiene un alto componente subjetivo al depender de un observador que registre con igual precisión el tiempo de duración de luminiscencia para todas las unidades experimentales. Tanto en el método convencional como en el propuesto por Robayo se requiere que cada unidad sea analizada por separado y dado que el tiempo de medición de cada muestra es de cerca de un minuto, un ensayo con un número razonable de concentraciones y replicas requiere más de una hora de tiempo de observación.

Por lo anterior, es necesario un método alternativo objetivo, cuantitativo y accesible. En el presente estudio se propone un nuevo método que registra los cambios en intensidad lumínica, usando la distancia geométrica a partir de análisis digital de imagen. Este método permite evaluar en paralelo todas las unidades experimentales al reducir el recipiente de ensayo a nivel de microplato. Sin embargo, se debe demostrar que el análisis digital de la imagen es tan fiable como el conteo de fotones y que puede conducir a la determinación repetible de la  $CI_{50}$ .

Los dinoflagelados luminiscentes alcanzan los niveles de máxima intensidad lumínica entre las 2 y 8 horas de la fase oscura. Por esto, en los ensayos con dinoflagelados típicamente se agrega el toxico en las primeras horas de la fase oscura y se determina el cambio de la intensidad lumínica después de 4 a 24 horas de incubación en oscuridad en un sistema estático sin renovación. Si la manipulación durante el proceso de medición no afecta la viabilidad de las células ni su capacidad posterior de producir luminiscencia, se podrían reportar varias  $CI_{50}$  para diferentes tiempos de exposición en un mismo recipiente. A partir de las consideraciones anteriores se plantearon las siguientes preguntas

**1) ¿Es el análisis informático de imagen un método fiable para cuantificar los cambios en la intensidad lumínica de *Pyrocystis lunula* en microplatos como recipientes de ensayo?**

**2) ¿Es posible obtener resultados reproducibles de los efectos del cobre y mercurio sobre la bioluminiscencia de *Pyrocystis lunula* usando análisis de imagen?**

### 3. HIPÓTESIS

- Dado que el análisis digital de imagen constituye un procedimiento adecuado para determinar y cuantificar los cambios en la intensidad lumínica de *P. lunula*; para diferentes densidades celulares se obtienen valores de luminiscencia consistentes y repetibles.
- La reducción de la intensidad de la bioluminiscencia de *P. lunula* luego de la exposición a cobre y mercurio puede ser cuantificada por análisis de imagen; en consecuencia, es posible determinar a través de este procedimiento una  $CI_{50}$  repetible luego del tratamiento de *P. lunula* con estas sustancias.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la factibilidad del empleo del análisis de imagen para cuantificar los efectos del Cu y del Hg sobre la capacidad bioluminiscente de *Pyrocystis lunula*, usando microplatos como recipientes de ensayo.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar y mantener la microalga dinoflagelada *Pyrocystis lunula* bajo condiciones de laboratorio a una concentración mínima de 2000 cel/ml.
- Diseñar y construir un equipo para la agitación de microplatos y la toma de fotografías para el análisis digital.
- Adaptar y programar un software para el análisis digital de imágenes y su transformación informática en una medida cuantitativa de la intensidad lumínica.
- Establecer los efectos del Cu y del Hg sobre la capacidad bioluminiscente de *Pyrocystis lunula* a través de análisis de imagen.
- Comparar las  $CI_{50}$  calculadas por análisis de imagen con las  $CI_{50}$  de referencia determinadas por conteo de fotones.

## 5. JUSTIFICACIÓN

A pesar de entregar información valiosa, los ensayos de toxicidad con vertebrados son muy demandantes en tiempo, espacio y costo. El uso alternativo de microorganismos en pruebas de toxicidad ha demostrado ser un mecanismo de alerta temprana sobre los cambios en la calidad de los ambientes acuáticos. Adicionalmente, la demanda de espacio, tiempo y los costos del empleo de microorganismos en ecotoxicología son significativamente más bajos que con otros organismos. Particularmente, el uso de microalgas en ensayos de toxicidad ha recibido considerable atención, debido a su alta sensibilidad y a su rápida capacidad de respuesta a contaminantes.

Las pruebas de toxicidad con algas dinoflageladas, usando la reducción de la bioluminiscencia como punto final, se han consolidado como una alternativa rápida para la detección de los efectos nocivos de sustancias tóxicas. Sin embargo, la limitación de esta técnica es el costo del equipo fotomultiplicador para medir los cambios en la intensidad de la luminiscencia.

En el presente estudio se pretendió validar una alternativa de medición cuantitativa y en paralelo de la intensidad lumínica de las células del alga *P. lunula* sometidas a diferentes concentraciones de Cu y Hg con el empleo del análisis digital. Los resultados de esta investigación avalan el uso del análisis digital de imagen en pruebas de toxicidad con dinoflagelados bioluminiscentes. Los laboratorios de ecotoxicología se beneficiarán de los resultados del presente estudio, ya que podrán incorporar este procedimiento a la batería de ensayos y ampliar el número de organismos de prueba.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 CONDICIONES DE CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE *Pyrocystis lunula*

*Pyrocystis lunula*, un dinoflagelado de amplia distribución en el Caribe, es la especie bioluminiscente con mayor adaptabilidad y estabilidad frente a cambios en los factores ambientales (Robayo, 1999). Además, genera una bioluminiscencia mucho más intensa que otras especies de dinoflagelados (Swift et al., 1976; Heimann et al., 2000, 2002).

La cepa LB 2271 de *P. lunula* fue adquirida en la Universidad de Texas (Austin, Texas). La aclimatación se hizo en los mismos recipientes de transporte dentro de una cámara de iluminación con fotoperiodo de 12:12 horas durante tres días a 20 °C, al cabo de este periodo se agitó el recipiente con las células en fase oscura para confirmar su viabilidad. Transcurrido el periodo de aclimatación, las células fueron cultivadas en recipientes de vidrio de 500 ml, en una proporción inicial de 10:1 (medio:cepa). En principio se usó el medio sintético para dinoflagelados (SDM), preparado según las recomendaciones de ASTM (1997) a partir de sal comercial y cuatro partes básicas de nutrientes. La salinidad se ajustó a 33 g/kg y el pH a 8.0.

Posteriormente, se evaluó el medio de cultivo L1, el cual se adquirió del Centro para cultivo de plancton marino adscrito al Laboratorio de ciencias oceánicas de Bigelow (Boothbay Harbor, Maine). Este medio se preparó con agua de mar natural procedente de San Bernardo del viento (Córdoba, Colombia) y cuatro soluciones de nutrientes (Tabla 1). El medio luego se microfiltró con filtros de nitrocelulosa de 0,2 µm y se conservó refrigerado a 6 °C. La salinidad se mantuvo a 33 ± 2 UPS y el pH a 8,0 ± 0,2. En el cuarto de algas del grupo GAIA se mantuvieron entre 5 y 10 cultivos en frascos de vidrio de 500 ml con tapón de caucho y dentro de una cámara de iluminación con luces fluorescentes de 20 vatios que alcanzaban una intensidad lumínica de aproximadamente 4000 lux, la temperatura se mantuvo alrededor de 20 °C y el fotoperiodo fue de 12:12 horas (Figura 4). La duplicación de los cultivos se hizo en una proporción 1:1 (medio:cepa) adicionando un inóculo de 100 ml de un cultivo de cuatro semanas a 100 ml de medio L1 fresco.



**Figura 4. Cultivos de *P. lunula* en la cámara de iluminación del grupo GAIA.**

**Tabla 1. Medio L1 para cultivo de microalgas marinas**

Medio L1			
A 1 L de agua de mar microfiltrada agregar			
Componente	Solución Stock	Cantidad	Concentración molar en el medio final
NaNO <sub>3</sub>	75.00 g/L	1 ml	8.82 x 10 <sup>-4</sup> M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	5.00 g/L	1 ml	3.62 x 10 <sup>-5</sup> M
solución de metales traza	(ver abajo)*	1 ml	---
solución de vitaminas	(ver abajo)**	1 ml	---
* Solución de metales traza. A 1 L de agua destilada agregar			
Componente	Solución Stock	Cantidad	Concentración molar en el medio final
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	---	4.36 g	1.17 x 10 <sup>-5</sup> M
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	---	3.15 g	1.17 x 10 <sup>-5</sup> M
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	178.10 g/L	1 ml	9.09 x 10 <sup>-7</sup> M
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	23.00 g/L	1 ml	8.00 x 10 <sup>-8</sup> M
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	11.90 g/L	1 ml	5.00 x 10 <sup>-8</sup> M
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	2.50 g/L	1 ml	1.00 x 10 <sup>-8</sup> M
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	19.9 g/L	1 ml	8.22 x 10 <sup>-8</sup> M
H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	1.29 g/L	1 ml	1.00 x 10 <sup>-8</sup> M
NiSO <sub>4</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2.63 g/L	1 ml	1.00 x 10 <sup>-8</sup> M
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1.84 g/L	1 ml	1.00 x 10 <sup>-8</sup> M
K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	1.94 g/L	1 ml	1.00 x 10 <sup>-8</sup> M
* Solución de vitaminas. A 1 L de agua destilada agregar			
Componente	Solución Stock	Cantidad	Concentración molar en el medio final
Tiamina · HCl	---	100 mg	2.96 x 10 <sup>-7</sup> M
Biotina	0.5 g/L	1 ml	2.05 x 10 <sup>-9</sup> M
Cianocobalamina	0.5 g/L	1 ml	3.69 x 10 <sup>-10</sup> M

Los implementos y vidriería utilizados en las siembras fueron previamente esterilizados. Los cultivos fueron analizados rutinariamente al microscopio para evaluar contaminación por bacterias, hongos u otras microalgas, los cultivos contaminados fueron descartados y reemplazados.

## 6.2 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL EQUIPO DE MEDICIÓN

Para la medición de la respuesta lumínica de *Pyrocystis lunula* se construyó un equipo especialmente diseñado para evaluar las múltiples unidades experimentales de un microplato de forma paralela. Este equipo está constituido por una cámara oscura (30 x 20 x 70 cm) con un agitador de microplatos (diámetro de orbita = 2 mm) en la parte inferior y un sistema en la parte superior para acoplar una cámara digital de parámetros ajustables (Canon Powershot A590 IS) con la que se tomaron las imágenes digitales para el análisis informático (Figura 5)



**Figura 5. Equipo de medición LumTox.**

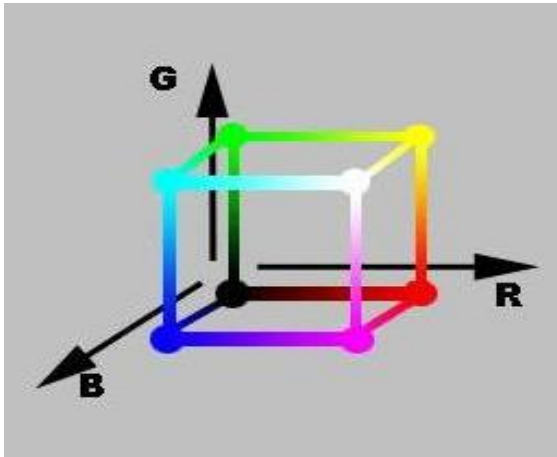
### **6.3 PROGRAMACIÓN DEL SOFTWARE PARA ANÁLISIS DE IMAGEN**

Experiencias exitosas en la aplicación del análisis de imagen para pruebas de toxicidad han sido reportadas por autores como Ridder et al. (1997), Kimura et al. (1999), Sakai et al. (2000), Ninomiya et al. (2003), Yoshioka et al. (2004), Cayuela et al. (2007). Incluso se ha empleado el análisis de imagen para desarrollar un biosensor de toxicidad con bacterias luminiscentes recombinantes (Lee et al., 2005).

Para convertir la información contenida en la matriz de píxeles de las fotografías en una matriz de datos fácilmente analizada en una hoja de cálculo, las imágenes fueron transformadas al formato de mapa de bits (bmp) y luego mediante el aplicativo de software libre *BMP to XLS* convertidas a una matriz de hoja de cálculo, de modo que cada píxel de la imagen de partida se correspondía con una celda de la hoja de cálculo. Luego, con *Excel* y *Visual Basic* (Microsoft®) se programó el análisis informático de los datos alojados en la hoja de cálculo. Dado que la totalidad de los colores en las imágenes digitales se forman de la combinación de diferentes coordenadas de rojo (*Red*), verde (*Green*) y azul (*Blue*) (Espacio RGB por sus siglas en inglés), para cuantificar la intensidad biolumínica en cada pozo del microplato se calculó el promedio de la distancia geométrica alcanzada por el nivel de estos colores en los píxeles de cada pozo, en relación al color negro, en el cual los niveles de rojo, verde y azul son cero. La distancia geométrica de cada píxel (*z*) respecto al origen (*o*) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$D(z,o) = [(z_R - o_R)^2 + (z_G - o_G)^2 + (z_B - o_B)^2]^{1/2}$$





**Figura 6. Esquema del espacio de color RGB.**

#### **6.4 PRUEBAS DE CALIBRACIÓN**

Para la calibración se trabajó con una densidad celular entre 1000 y 2000 cel/ml en cultivos madre. Estas pruebas se realizaron después de 4 horas de iniciada la fase oscura y en completa oscuridad.

**6.4.1 Registro fotográfico de la bioluminiscencia.** Los cultivos madre fueron fotografiados en agitación constante, con el fin de obtener la mejor configuración de parámetros en la exposición fotográfica. Para esto, se variaron en la cámara digital la apertura de diafragma, velocidad de obturación, sensibilidad ISO, balance de blancos y distancia de enfoque.

**6.4.2 Velocidad de agitación en microplatos.** Con el agitador de microplatos se evaluó el efecto de tres velocidades de agitación (6000, 8000 y 10000 orbitas por minuto) en la luminiscencia emitida por *P. lunula*, sin el deterioro de las células.



**Figura 7. Agitador de microplatos del equipo LumTox.**

**6.4.3 Homogeneidad de respuesta lumínica en microplatos.** De los 96 pozos de los microplatos (12 columnas x 8 filas) se excluyeron las dos primeras y las dos últimas columnas para un total de 64 pozos como unidades experimentales (8 columnas x 8 filas). Con el fin de descartar algún efecto de posición en la respuesta lumínica de los pozos, se agregaron 270 µl de un cultivo con 2000 cel/ml (aproximadamente 540 células) a cada pozo seleccionado y se evaluó la intensidad lumínica de las diferentes filas para ver si presentaban diferencias significativas.

**6.4.4 Relación entre intensidad lumínica y densidad celular.** Para observar la repetibilidad de los cambios en la intensidad lumínica en los microplatos asociados a la densidad celular y para establecer la densidad celular para las pruebas definitivas, fueron evaluadas ocho densidades celulares (1800, 900, 448, 224, 112, 56, 28 y 14 cel/ml).

## **6.5 PRUEBAS DE TOXICIDAD**

**6.5.1 Procedimiento general.** Las pruebas de toxicidad se realizaron en el laboratorio del grupo GAIA. Para los ensayos se utilizaron células de cultivos madre puros de 4 semanas y con una densidad celular de al menos 2000 cel/ml. Para eliminar el EDTA del medio de cultivo y evitar la quelación de los cationes de Cu y Hg, se lavo el cultivo para retirar el medio L1 y se reemplazo por agua de mar microfiltrada.

Previo al inicio de las pruebas se midieron el pH, la temperatura, la salinidad y la densidad celular. Una hora antes de finalizar la fase lumínica, las células del cultivo madre se agitaron en *vortex* para separar aglomeraciones y después se diluyeron con agua de mar microfiltrada hasta alcanzar aproximadamente 1000 cel/ml. De esta dilución fueron agregados aleatoriamente 210 µl (aproximadamente 210 células de *P. lunula*) a 64 pozos del microplato. Aproximadamente 30 minutos después de iniciada la fase oscura, se agregaron 60 µl de la solución del metal en agua de mar microfiltrada. El volumen final del recipiente fue 270 µl. Los microplatos fueron sellados e incubados por 4 horas.

Luego de la incubación, se tomaron las imágenes en condiciones de oscuridad con los parámetros definidos en las pruebas de calibración. En cada experimento se evaluaron ocho réplicas por nivel de exposición y control. Se tomaron registros fotográficos a las 4 horas de exposición de *P. lunula* a cada metal. En el caso del Cu se tomaron registros fotográficos adicionales a las 28 y 52 horas. Inmediatamente se tomaba la fotografía se devolvía el microplato a la cámara ambiental para continuar su incubación en oscuridad. El tiempo de medición promedio para cada microplato con 64 unidades experimentales fue de 1 minuto. Una vez terminado el ensayo, se realizó el descarte del toxico siguiendo el protocolo del laboratorio del grupo GAIA.

**6.5.2 Soluciones *stock* y diluciones de contaminantes.** Las soluciones madre de cobre y mercurio fueron preparadas en agua destilada a partir de las sales CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O y HgCl<sub>2</sub>. No se usaron ácidos para estabilizar las soluciones madre, ya que estos afectan la bioluminiscencia en los dinoflagelados (Heimann et al., 2002; Craig et al., 2003). El día de la prueba, se diluyo una alícuota de la solución madre con agua de mar microfiltrada hasta encontrar las diferentes concentraciones fijadas para los bioensayos. Las concentraciones

de Cu evaluadas fueron 75, 150, 300, 600, 1200, 2400 y 4800 ppb. Por su parte, las concentraciones de Hg probadas fueron 40, 80, 160, 320, 640, 1280 y 2560 ppb. Las condiciones del ensayo con *P. lunula* se resumen en la tabla 2.

## 6.6 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

En cada una de las pruebas, realizadas por triplicado, se evaluaron 7 tratamientos o concentraciones del metal y un control negativo, se incluyeron 8 réplicas para los controles y para los diferentes tratamientos, para un total de 64 unidades experimentales por prueba. La variable respuesta, la distancia geométrica de la intensidad lumínica, se midió en paralelo y se registro para cada unidad experimental. La media aritmética, la mediana, la desviación estándar y el coeficiente de variación fueron calculados para cada tratamiento. La media de cada tratamiento se comparó con la media del control mediante la ecuación:

$$\% \text{ del control} = (\text{media del tratamiento X} / \text{media del control}) \times 100$$

Los datos se analizaron usando el programa estadístico Statgraphics Centurion XV. La homogeneidad de las varianzas y la normalidad de los datos se evaluaron a través de las prueba de Levene's y de Shapiro-Wilk. Si los datos cumplían los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se aplicaron ANOVA, la prueba de rangos múltiples y la comparación de medias para determinar si las diferencias encontradas eran significativas. Si los requisitos de parametricidad no se cumplían, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Para el cálculo de las CI<sub>50</sub>, los valores de la intensidad lumínica (porcentaje del control) se graficaron frente al logaritmo en base 10 de las concentraciones del metal. Las concentraciones alrededor del 50% de inhibición lumínica fueron seleccionadas y a partir de ellas las CI<sub>50</sub> se estimaron gráficamente y se determinaron estadísticamente por regresión lineal. Finalmente, las CI<sub>50</sub> de los tres ensayos de cada metal se promediaron y se calcularon los intervalos de confianza.

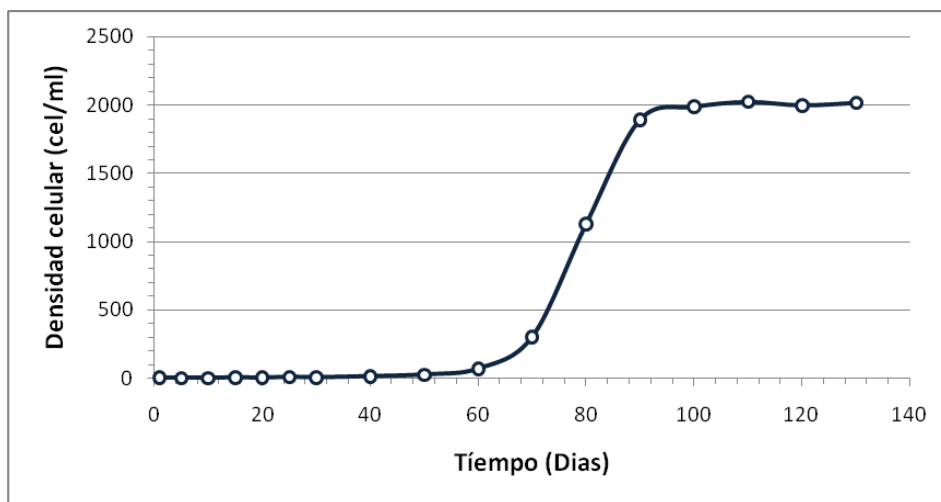
**Tabla 2. Condiciones experimentales de la exposición de *P. lunula* a Cu y Hg.**

Variable	Descripción
Tipo de ensayo	Estático sin renovación
Temperatura	20 ± 2 °C
Intensidad luminosa	60-80µE/m2/S (4000 lux)
Fotoperiodo	12:12
Salinidad	33 ± 2 g/Kg
pH	8,0 ± 0.2
Volumen del recipiente de ensayo	Pozos de microplato de 320 µl
Volumen de la solución de prueba	270 µl
Edad del cultivo como inóculo	4 semanas
Densidad celular del ensayo	1000 cel/ml
Número de réplicas	8
Agua de dilución	Agua de mar microfiltrada
Factor de dilución	0,5
Concentraciones de prueba	7 + un control negativo
Duración de la prueba	4, 28 y 52 horas (Cu) 4 horas (Hg)
Efecto medido	Intensidad lumínica por análisis de imagen
Resultado final	CI <sub>50</sub>

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 ACLIMATACIÓN Y CULTIVO

De los cinco recipientes procedentes del cepario, solo tres presentaron bioluminiscencia. La observación al microscopio de los otros dos evidenció solo la presencia de restos celulares y no de células viables y en consecuencia, fueron descartados. El contenido de los recipientes con emisión lumínica fue traspasado a recipientes de vidrio de 500 ml con 100 ml de medio sintético para dinoflagelados (SDM). Aunque la observación al microscopio evidenció células intactas, la densidad celular alcanzó solo de 2 a 4 cel/ml. El seguimiento de la bioluminiscencia y de la densidad de los cultivos mostró que las células permanecieron dos meses en fase de adaptación, luego se observaron células en mitosis. Esta fase se extendió aproximadamente durante dos meses, debido a que la duplicación de *P. lunula* requiere cuatro días. De este modo, se necesitaron cuatro meses para que un cultivo madre alcance 2000 cel/ml. La curva de crecimiento de este primer cultivo se muestra en la figura 8.



**Figura 8. Curva de crecimiento del primer cultivo de *Pyrocystis lunula***

Debido a que el medio SDM no pareció estimular adecuadamente el crecimiento de los cultivos de *P. lunula*, se empleó el medio L1. Este medio se preparó con agua de mar natural colectada en San Bernardo del viento, añejada por tres meses en oscuridad y microfiltrada.

En las diluciones 10:1 (medio:cepa) las células permanecían un tiempo prolongado en la fase de adaptación. Para evitar esta situación los cultivos madre se mantuvieron en una dilución 1:1 (medio:cepa) y luego, al final de su fase de crecimiento exponencial (2000 cel/ml), se agregaron 100 ml del cultivo madre a 100 ml de medio. Con esta técnica, se obtuvieron nuevos cultivos madre solo en cuatro semanas, en lugar de cuatro meses. En la figura 9 se muestran células de cultivos madre.



**Figura 9. Células de *Pyrocystis lunula* cultivadas en medio L1.**

## **7.2 PRUEBAS DE CALIBRACIÓN**

**7.2.1 Registro fotográfico de la bioluminiscencia.** A pesar de que los cultivos madre estuvieran en el pico de densidad celular, la calidad de las fotografías luego de la agitación de los cultivos en total oscuridad fue muy deficiente. En consecuencia, se modificaron las condiciones de operación de la cámara digital, con el fin de perfeccionar la calidad de la imagen. Se encontró que la imagen mejoraba ostensiblemente con una mayor apertura del diafragma y velocidad de obturación, sensibilidad ISO intermedia, balance de blancos intenso y enfoque en infinito. La configuración óptima de los parámetros para la cámara Canon Powershot A590IS se resume en la tabla 3. Una imagen tomada a los cultivos madre con estas condiciones se aprecia en la figura 10.

**Tabla 3. Configuración de parámetros para la cámara Powershot A590IS.**

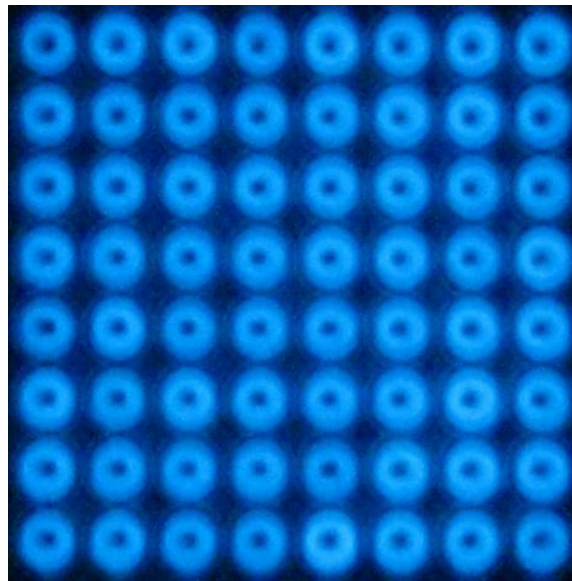
<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Apertura de diafragma	2.6
Velocidad de obturación	15 s
Sensibilidad ISO	400
Balance de blancos	Intenso
Distancia de enfoque	Infinito



**Figura 10. Cultivo madre de *Pyrocystis lunula* registrado en fase oscura.**

**7.2.2 Velocidad de agitación en microplatos.** Debido al pequeño volumen de los microplatos (270  $\mu$ l), fue necesario aplicar alta velocidad de agitación para estimular plenamente la emisión lumínica de las células. Para esto se evaluaron tres revoluciones diferentes. Mientras a 6000 opm la estimulación lumínica fue débil para su adecuado registro fotográfico, a 8000 opm se presentó mejor emisión de luz. Por su parte, a 10000 opm se observó la mayor intensidad lumínica durante los 15 segundos de exposición fotográfica. Dado que la observación al microscopio demostró que las células permanecían inalteradas, fue elegida la velocidad de 10000 opm para realizar las pruebas de calibración y los ensayos de toxicidad.

**7.2.3 Homogeneidad de respuesta lumínica en microplatos.** En la imagen obtenida con el equipo LumTox (Figura 11), se observa que la luminiscencia emitida desde cada pozo no se solapa con la de los pozos adyacentes. El círculo oscuro en el centro de los pozos corresponde al *vortex* que se forma en cada uno de estos al activar el agitador de microplatos. Para el análisis cada pozo fue identificado inequívocamente con la letra de la columna (de la A a la H) y con el número de la fila (del 1 al 8).



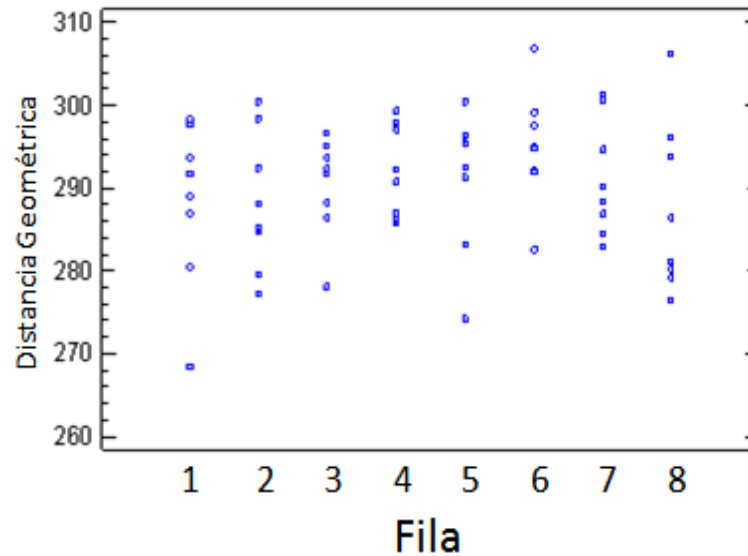
**Figura 11. Registro fotográfico del comportamiento de la luminosidad de *P. lunula* en la prueba de homogeneidad lumínica.**

Mediante el uso del aplicativo informático diseñado durante esta investigación, la intensidad lumínica de cada pozo se determinó a partir de la distancia geométrica entre el nivel de los colores rojo, verde y azul en la imagen digital de cada pozo y el nivel basal de estos colores, es decir, cuando sus niveles son cero y dan como resultado el color negro. Los datos de distancia geométrica (Tabla 4) mostraron una gran concordancia con la inspección visual de la fotografía.

**Tabla 4. Distancia geométrica de la intensidad de bioluminiscencia de *P. lunula* en la prueba de homogeneidad lumínica.**

A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
268,50	286,99	293,67	280,53	298,33	291,80	297,75	289,08
A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2
277,36	279,47	284,65	288,13	292,39	298,28	300,47	285,13
A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3	H3
278,05	288,21	291,72	293,74	295,16	296,56	292,38	286,41
A4	B4	C4	D4	E4	F4	G4	H4
285,80	286,97	286,20	292,20	296,99	299,24	290,80	297,92
A5	B5	C5	D5	E5	F5	G5	H5
274,17	295,45	283,31	291,20	292,55	296,37	300,47	295,24
A6	B6	C6	D6	E6	F6	G6	H6
292,13	282,61	297,60	294,78	294,95	299,15	306,92	291,94
A7	B7	C7	D7	E7	F7	G7	H7
286,89	284,57	288,40	290,13	282,92	300,59	301,22	294,63
A8	B8	C8	D8	E8	F8	G8	H8
279,29	286,39	281,17	280,21	306,14	296,10	293,91	276,43

El gráfico de dispersión y el resumen estadístico, para los 8 datos de distancia geométrica de cada una de las 8 filas de microplato, entregados por el programa Statgraphics Centurion XV, se presentan en la figura 12 y en la tabla 5.



**Figura 12. Dispersión de datos de distancia geométrica para la prueba de homogeneidad lumínica**

En la tabla 5 se destaca que los valores de sesgo estandarizado y curtosis estandarizada para las ocho filas están dentro del rango de 2 a -2, lo cual sugiere distribución normal de los datos, con el fin de confirmar este comportamiento se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para los datos de cada fila.

**Tabla 5. Resumen estadístico de la prueba de homogeneidad lumínica**

Fila	n	Media	Mediana	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo Estándar	Curtosis Estándar
1	8	288,33	290,44	9,89747	3,43267%	268,50	298,33	29,83	-1,41710	0,826198
2	8	288,24	286,63	8,32772	2,88921%	277,36	300,47	23,11	0,335622	-0,646235
3	8	290,28	292,05	5,98263	2,06099%	278,05	296,56	18,51	-1,51773	1,018060
4	8	292,02	291,50	5,49315	1,88112%	285,80	299,24	13,44	0,184841	-1,12486
5	8	291,10	293,90	8,46044	2,90642%	274,17	300,47	26,30	-1,52264	0,836995
6	8	295,01	294,86	6,94089	2,35276%	282,61	306,92	24,31	-0,119525	0,945817
7	8	291,17	289,26	6,97348	2,39500%	282,92	301,22	18,30	0,612177	-0,723881
8	8	287,46	283,78	10,3294	3,59340%	276,43	306,14	29,71	0,982726	-0,173006
<b>Total</b>	<b>64</b>	<b>290,45</b>	<b>291,87</b>	<b>7,86702</b>	<b>2,70858%</b>	<b>268,50</b>	<b>306,92</b>	<b>38,42</b>	<b>-1,30707</b>	<b>-0,068142</b>

Debido a que el valor-P de las pruebas fue mayor en todos los casos a 0,05, se aceptó la hipótesis nula, es decir los datos de todas las filas provienen de una distribución normal con 95% de confianza (Tabla 6). Luego de comprobarse la normalidad, se verificó el supuesto de varianzas homogéneas. Para esto, se aplicó la prueba de verificación de varianza de Levene's (Tabla 7).

**Tabla 6. Pruebas de normalidad para la prueba de homogeneidad lumínica**

Fila	Estadístico	Valor-P
1	0,898299	0,283136
2	0,949410	0,707611
3	0,894623	0,26225
4	0,886856	0,222373
5	0,874726	0,170654
6	0,955051	0,762918
7	0,910478	0,36217
8	0,904818	0,323527

Dado que el valor-P de la tabla 7 es mayor a 0,05, se aceptó la hipótesis nula de que las varianzas dentro de cada una de las 8 filas son iguales. Es decir, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas, con un nivel del 95% de confianza. Una vez confirmados los supuestos anteriores, se aplicó un ANOVA para confirmar si las diferencias entre filas eran significativas.

**Tabla 7. Verificación de la varianza para la prueba de homogeneidad lumínica**

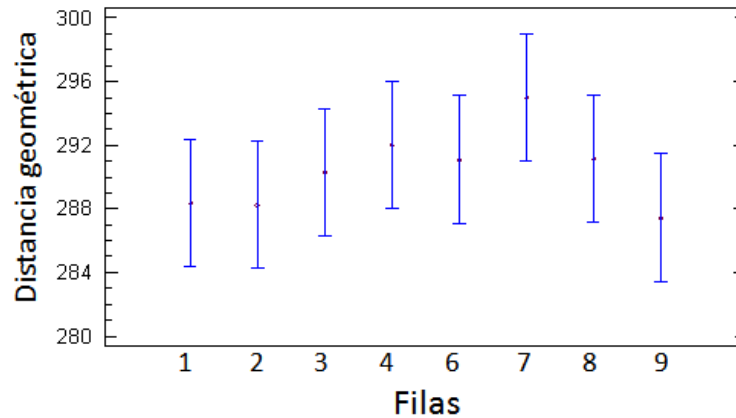
	Prueba	Valor-P
Levene's	0,545675	0,79609

Como se evidencia en el ANOVA (Tabla 8), el valor del cociente entre grupos e intra grupos fue 0,77. Dado que el valor-P asociado a dicho cociente es mayor a 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 8 filas con un nivel del 95% de confianza. En la figura 13 se ilustra gráficamente este resultado.



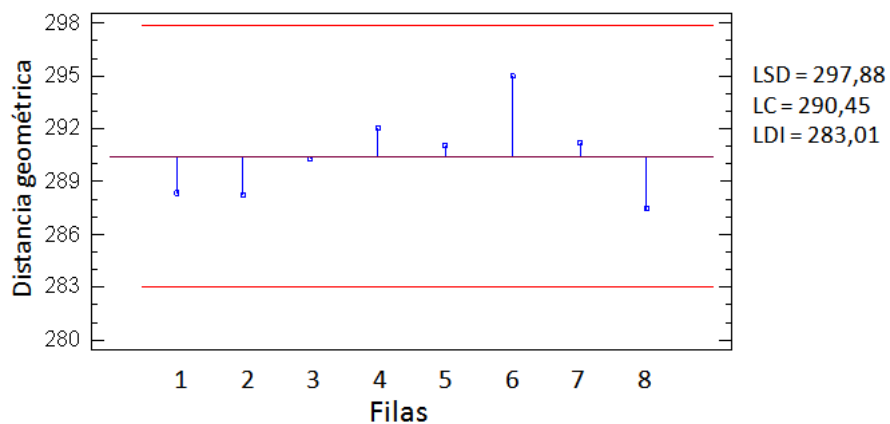
**Tabla 8. ANOVA para la prueba de homogeneidad lumínica**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	340,561	7	48,6516	0,77	0,6183
Intra grupos	3558,51	56	63,5448		
Total (Corr.)	3899,07	63			



**Figura 13. Gráfica de medias con intervalos de confianza para la prueba de homogeneidad lumínica.**

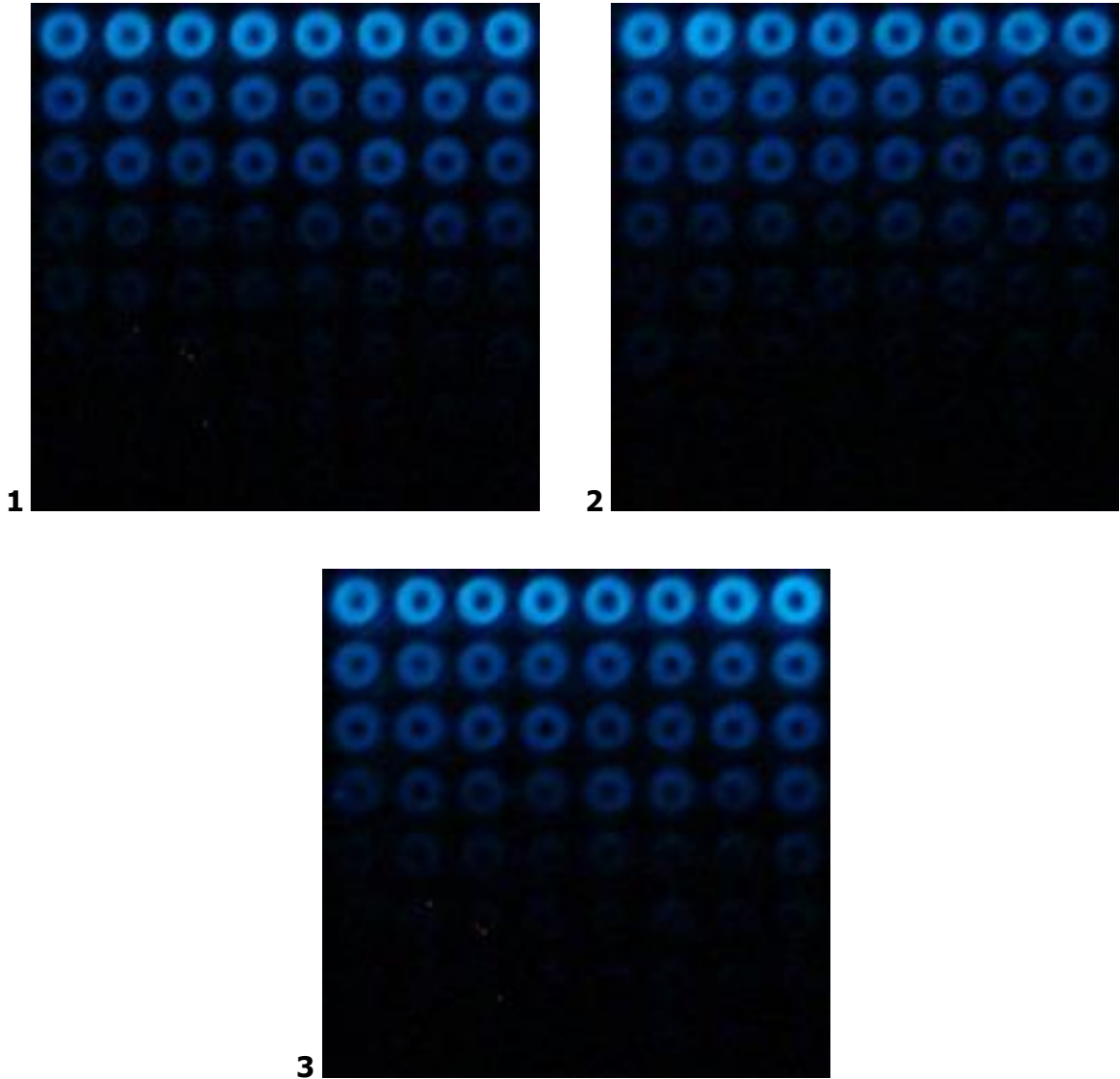
La figura 14 muestra la media de la distancia geométrica para los 64 pozos (290,45) y la diferencia de la media de cada fila respecto a la media general. Dado que todas las medias de fila se encontraron dentro de los límites de decisión se refuerza la conclusión de que no existen diferencias entre las medias de las filas con un nivel del 95% de confianza.



**Figura 14. Gráfica de análisis medias con límites de decisión para la prueba de homogeneidad lumínica.**

Los resultados anteriores demostraron que independientemente de la ubicación de los pozos en el microplato, el estímulo mecánico de la agitación fue igual para todos y por tanto, la respuesta lumínica fue también similar. De acuerdo a estos resultados, se relacionó la intensidad lumínica con la densidad celular.

**7.2.4 Relación entre la intensidad lumínica y densidad celular.** Se evaluaron, por triplicado, ocho densidades celulares: 1800 (fila 1), 900 (fila 2), 448 (fila 3), 224 (fila 4), 112 (fila 5), 56 (fila 6), 28 (fila 7) y 14 cel/ml (fila 8). Las imágenes registradas con el equipo LumTox se muestran en la figura 15.



**Figura 15. Registro fotográfico del comportamiento de la luminosidad de *P. lunula* a diferentes densidades celulares.**

Los resultados de la distancia geométrica para cada pozo en las tres pruebas, obtenidos mediante el análisis informático de imagen se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9. Distancia geométrica de la intensidad lumínica de *P. lunula* a diferentes densidades celulares.**

A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
213,50	235,59	238,43	248,07	241,42	246,02	223,38	246,80
A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2
133,85	143,99	141,97	149,79	135,32	137,97	158,69	172,71
A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3	H3
83,84	119,28	103,36	115,94	116,98	134,18	123,61	113,01
A4	B4	C4	D4	E4	F4	G4	H4
38,09	46,34	41,28	42,58	60,74	62,64	77,41	75,56
A5	B5	C5	D5	E5	F5	G5	H5
30,05	32,48	22,77	25,45	31,32	34,23	30,68	29,36
A6	B6	C6	D6	E6	F6	G6	H6
14,22	17,52	17,54	12,93	18,25	19,10	16,62	23,28
A7	B7	C7	D7	E7	F7	G7	H7
8,87	8,59	11,85	14,05	15,64	14,58	12,38	11,72
A8	B8	C8	D8	E8	F8	G8	H8
8,19	8,17	8,49	9,04	11,05	9,95	9,12	10,91

**1**

A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
242,52	268,67	227,03	225,86	224,41	222,17	221,72	219,64
A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2
155,03	139,04	142,52	131,29	132,86	122,18	125,73	131,68
A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3	H3
101,39	106,21	116,90	105,88	108,03	94,86	96,30	97,79
A4	B4	C4	D4	E4	F4	G4	H4
62,39	60,14	56,53	39,57	62,64	57,47	60,77	49,98
A5	B5	C5	D5	E5	F5	G5	H5
23,54	35,25	25,59	29,65	24,87	36,03	25,19	26,37
A6	B6	C6	D6	E6	F6	G6	H6
27,01	16,99	17,19	13,89	16,25	14,74	16,38	15,96
A7	B7	C7	D7	E7	F7	G7	H7
11,52	11,47	10,27	9,68	9,98	10,40	12,83	9,89
A8	B8	C8	D8	E8	F8	G8	H8
10,00	9,30	6,92	11,57	9,05	8,27	8,36	7,64

**2**

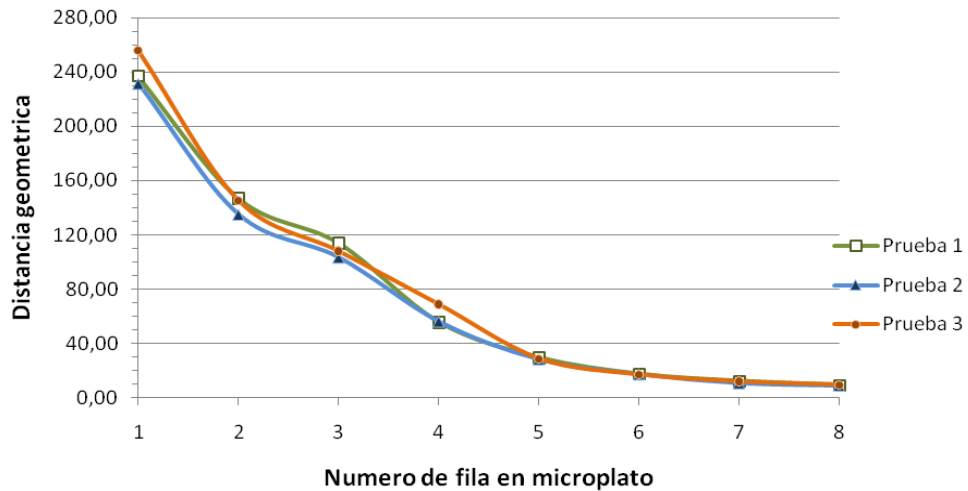
**3**

A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
238,94	249,96	253,19	260,72	238,67	241,17	273,35	290,20
A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2
148,03	143,12	138,44	137,40	138,41	133,88	149,97	174,68
A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3	H3
108,52	110,36	109,73	110,87	91,36	97,24	115,24	121,84
A4	B4	C4	D4	E4	F4	G4	H4
60,22	65,07	61,30	53,51	82,03	78,74	68,01	82,58
A5	B5	C5	D5	E5	F5	G5	H5
18,83	33,56	30,39	22,42	31,88	25,68	26,32	42,75
A6	B6	C6	D6	E6	F6	G6	H6
13,25	18,53	15,17	17,64	15,65	22,50	15,81	19,99
A7	B7	C7	D7	E7	F7	G7	H7
9,28	10,67	13,12	13,08	11,99	14,81	11,45	12,91
A8	B8	C8	D8	E8	F8	G8	H8
8,50	8,17	9,64	8,48	9,28	11,89	11,38	10,27

Estos datos evidenciaron para cada prueba concordancia con la inspección visual de la fotografía correspondiente. El promedio de los valores de distancia geométrica para cada una de las filas de las 3 pruebas se muestra en la tabla 10. Además las curvas de disminución lumínica para cada prueba se pueden apreciar en la figura 16.

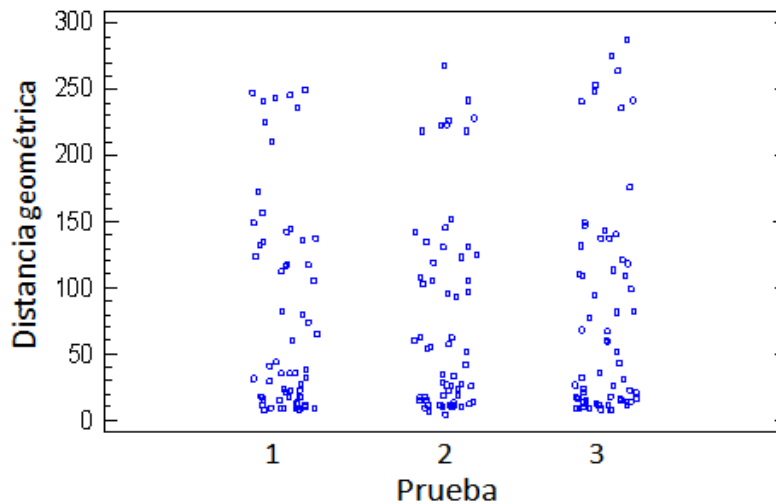
**Tabla 10. Promedio de la distancia geométrica de los 8 pozos de cada fila para las tres pruebas de densidad celular con *P. lunula*.**

Fila	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
1	236,65	231,50	255,78
2	146,78	135,04	145,49
3	113,77	103,42	108,14
4	55,58	56,19	68,93
5	29,54	28,31	28,98
6	17,43	17,30	17,32
7	12,21	10,75	12,16
8	9,37	8,89	9,70



**Figura 16. Disminución lumínica en *P. lunula* para las pruebas de densidad celular.**

Las curvas de disminución lumínica mostraron un comportamiento muy similar. En la figura 17 la dispersión de los datos observa una concentración hacia valores bajos de distancia geométrica, lo cual es característico de una distribución sesgada. Por su parte, el análisis estadístico muestra valores de sesgo estandarizado por fuera del rango para distribución normal y al comparar las medianas y las medias, se encontró que el sesgo era a la izquierda (Tabla 11).



**Figura 17. Dispersión de datos de distancia geométrica para las pruebas de densidad celular.**

Dado que no se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos, se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para establecer si existían diferencias entre los datos de densidad celular. En la tabla 12 se presentan los resultados de esta prueba.

**Tabla 11. Resumen estadístico para las pruebas de densidad celular.**

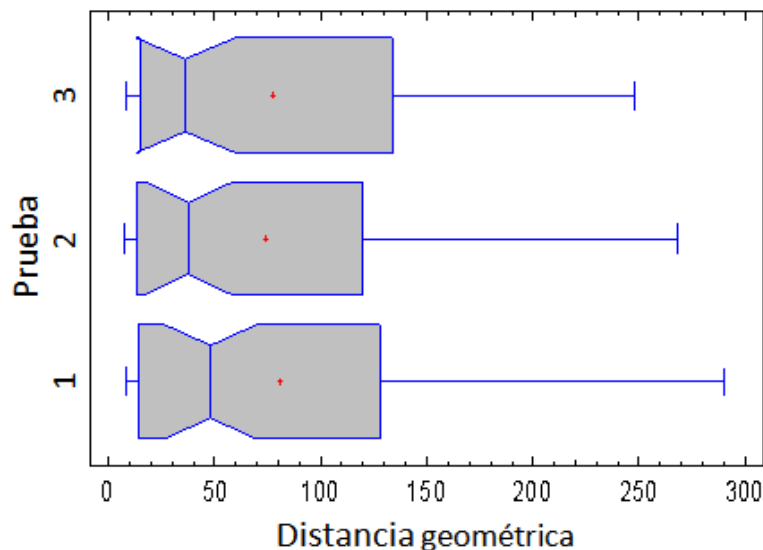
Prueba	N	Media	Mediana	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo Estándar	Curtosis Estándar
1	64	77,67	36,16	77,6342	99,9567%	8,17	248,07	239,90	3,25008	-0,438311
2	64	73,93	37,80	74,5203	100,804%	6,92	268,67	261,75	3,61107	0,206737
3	64	80,81	48,13	81,9289	101,381%	8,17	290,20	282,03	3,69734	0,374088
<b>Total</b>	<b>192</b>	<b>77,47</b>	<b>38,83</b>	<b>77,7283</b>	<b>100,335%</b>	<b>6,92</b>	<b>290,20</b>	<b>283,28</b>	<b>6,06015</b>	<b>0,0381</b>

Puesto que el valor-P es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de las 3 pruebas con un nivel del 95% de confianza. Este resultado se corrobora con la gráfica de caja y bigotes en la figura 18.

**Tabla 12. Prueba de Kruskal Wallis aplicada a las pruebas de densidad celular.**

Prueba	Tamaño de Muestra	Rango Promedio
1	64	97,4219
2	64	93,2656
3	64	98,8125

Estadístico = 0,345259 Valor-P = 0,841449

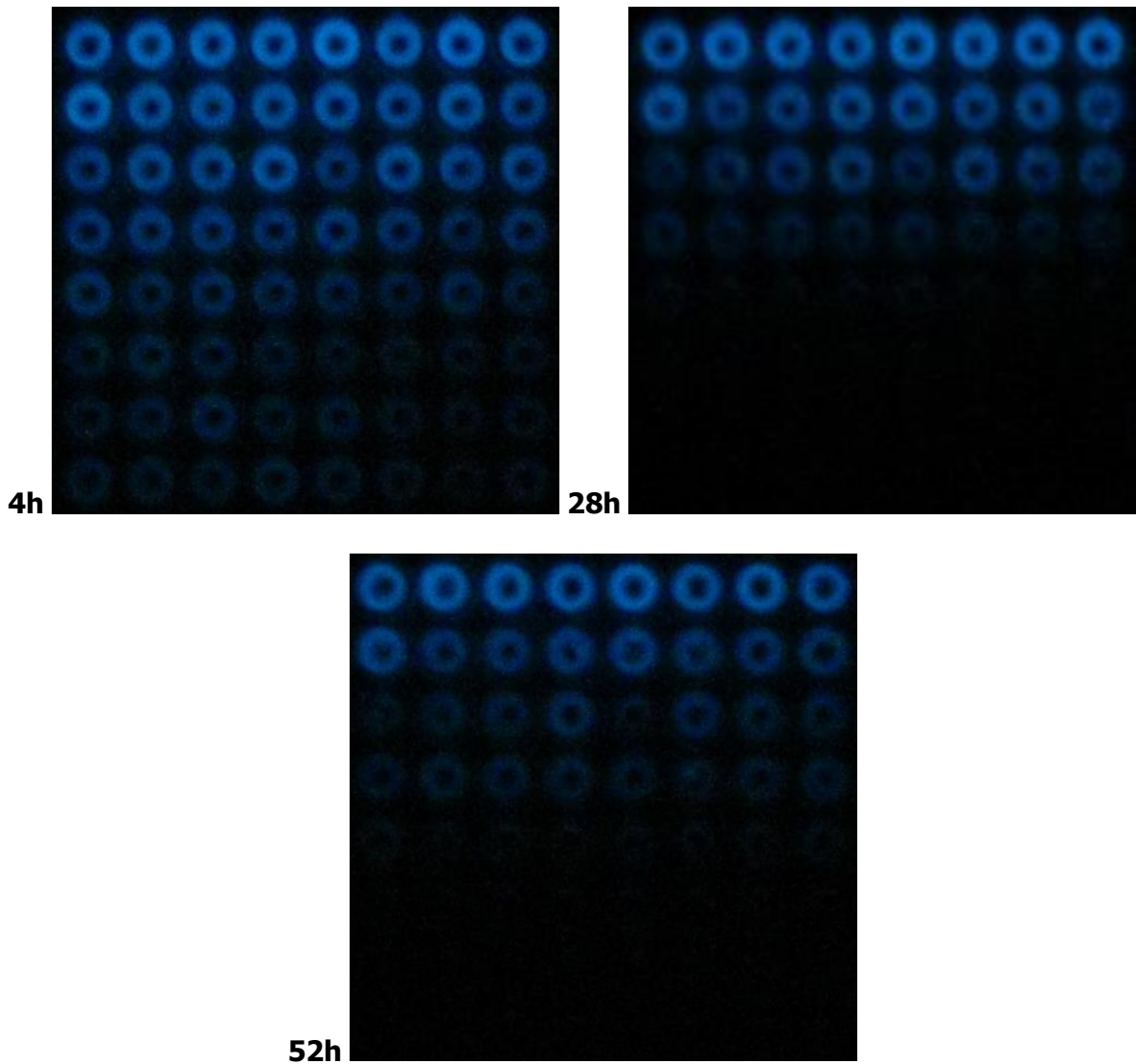


**Figura 18. Caja y bigotes para las pruebas de densidad celular.**

Los resultados demostraron que los cambios en la respuesta lumínica asociados a las diferencias en la densidad celular eran repetibles en pruebas independientes. Se encontró que las densidades entre 448 y 1800 cel/ml eran las más indicadas para las pruebas de inhibición de bioluminiscencia, ya que en este intervalo es posible resolver adecuadamente una curva de inhibición lumínica con el equipo LumTox. Densidades inferiores a 448 cel/ml no son recomendables con este equipo, debido a que el ruido de fondo en la imagen tiende a opacar la señal lumínica proveniente de los pozos. Por tanto, para el mejor balance entre la calidad de la imagen y el potencial de sensibilidad se eligió una densidad celular de 1000 cel/ml.

### 7.3 PRUEBAS DE TOXICIDAD

**7.3.1 Toxicidad del cobre.** Estas pruebas se realizaron por triplicado con un control negativo (fila 1) y siete concentraciones de Cu, así: 75 (fila 2), 150 (fila 3), 300 (fila 4), 600 (fila 5), 1200 (fila 6), 2400 (fila 7) y 4800 ppb (fila 8). Las imágenes obtenidas con el equipo LumTox para la prueba 1, luego de 4, 28 y 52 horas de exposición al Cu, se muestran en la figura 19.



**Figura 19. Registro fotográfico del comportamiento de la luminosidad de *P. lunula* tratada con Cu durante tres periodos de exposición.**

Los datos de distancia geométrica para la intensidad lumínica de *P. lunula* (expresados como porcentaje del control) en cada pozo durante las tres exposiciones a Cu se muestran en la tabla 13.

**Tabla 13. Distancia geométrica de la intensidad lumínica de *P. lunula* (fracción del control) sometida a Cu durante tres periodos de exposición.**

	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
4h	91,75	100,73	100,56	101,33	112,24	95,68	105,10	92,61
	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2
	98,88	85,28	84,62	85,18	87,42	78,76	86,36	71,39
	A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3	H3
	61,58	74,19	75,08	85,45	55,94	77,16	68,49	69,15
	A4	B4	C4	D4	E4	F4	G4	H4
	54,24	58,26	58,32	51,95	56,69	50,20	37,58	45,10
	A5	B5	C5	D5	E5	F5	G5	H5
	45,12	34,61	42,59	37,33	33,81	27,90	33,63	25,46
	A6	B6	C6	D6	E6	F6	G6	H6
	22,35	29,59	26,96	21,73	17,94	16,32	15,72	15,83
	A7	B7	C7	D7	E7	F7	G7	H7
	18,02	23,31	30,89	19,11	22,73	15,31	12,35	13,73
	A8	B8	C8	D8	E8	F8	G8	H8
	19,63	19,13	18,64	22,98	18,41	14,23	9,88	13,23

	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
28h	91,19	101,00	99,27	96,87	106,13	102,05	102,97	100,54
	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2
	84,01	63,89	70,23	79,69	81,82	72,68	77,49	68,04
	A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3	H3
	29,42	41,46	52,93	59,82	38,95	61,35	52,62	49,88
	A4	B4	C4	D4	E4	F4	G4	H4
	24,54	22,03	25,60	24,35	26,11	21,73	21,07	17,29
	A5	B5	C5	D5	E5	F5	G5	H5
	9,48	7,42	7,57	8,89	10,30	7,67	7,27	6,23
	A6	B6	C6	D6	E6	F6	G6	H6
	4,60	4,56	4,40	4,65	4,75	4,37	4,32	4,12
	A7	B7	C7	D7	E7	F7	G7	H7
	3,87	3,62	3,83	3,63	3,76	3,75	3,68	4,05
	A8	B8	C8	D8	E8	F8	G8	H8
	3,27	3,43	3,69	3,49	3,37	3,96	3,36	3,34

	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
52h	95,98	105,36	103,32	101,33	109,11	93,65	100,02	91,24
	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2
	80,09	56,10	57,59	67,67	69,97	56,48	56,68	52,11
	A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3	H3
	19,47	27,15	31,66	43,82	19,38	39,58	30,67	28,27
	A4	B4	C4	D4	E4	F4	G4	H4
	21,98	26,34	26,50	27,19	22,90	21,95	22,52	23,92
	A5	B5	C5	D5	E5	F5	G5	H5
	12,02	9,20	10,01	9,72	10,30	10,27	10,48	11,76
	A6	B6	C6	D6	E6	F6	G6	H6
	5,20	5,31	5,82	5,89	6,21	5,58	5,96	5,57
	A7	B7	C7	D7	E7	F7	G7	H7
	4,42	4,81	4,53	4,85	4,87	4,85	5,07	4,72
	A8	B8	C8	D8	E8	F8	G8	H8
	4,04	4,37	4,50	4,67	4,39	4,24	4,61	4,56

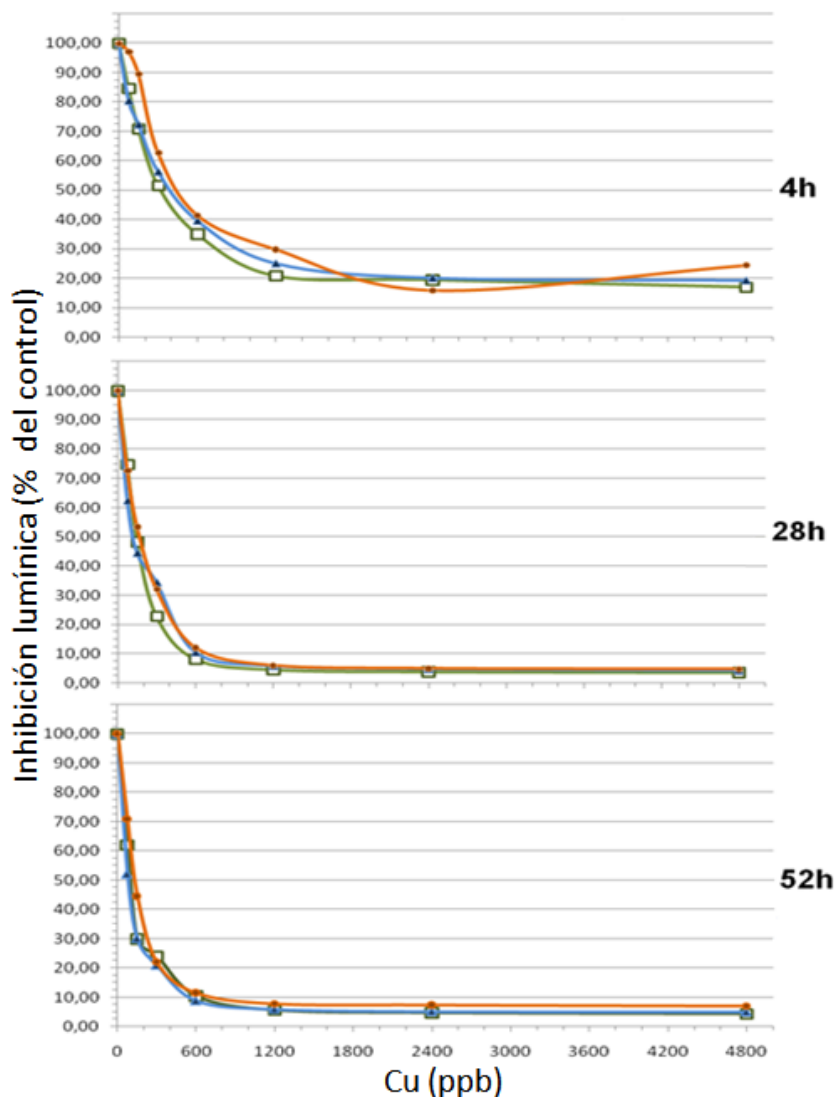
Los resultados de las tres exposiciones de la prueba 1 fueron concordantes con la inspección visual de la fotografía correspondiente. Resultados similares se encontraron para las tres exposiciones de las pruebas 2 y 3 (datos no mostrados). Las medias de los valores de distancia geométrica (como porcentaje de control) para cada concentración de las tres exposiciones se muestran en la tabla 14.

**Tabla 14. Promedio de distancia geométrica (%) para cada concentración de Cu en las tres pruebas y en los tres periodos de exposición.**

Cu (ppb)	Prueba (%DG)*								
	1			2			3		
	4h	28h	52h	4h	28h	52h	4h	28h	52h
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
75	84,74	74,73	62,09	80,57	62,45	52,06	97,10	72,62	71,00
150	70,88	48,30	30,00	72,41	44,52	30,08	89,58	53,45	44,65
300	51,54	22,84	24,16	56,33	34,49	20,93	62,75	32,09	22,06
600	35,06	8,10	10,47	39,62	10,52	8,77	41,52	12,10	11,59
1200	20,81	4,47	5,69	25,01	5,79	5,85	29,89	6,02	7,90
2400	19,43	3,77	4,76	20,04	4,75	5,07	15,96	4,98	7,49
4800	17,02	3,49	4,42	19,21	4,23	4,92	24,44	4,74	7,12

\* %DG = Porcentaje de distancia geométrica

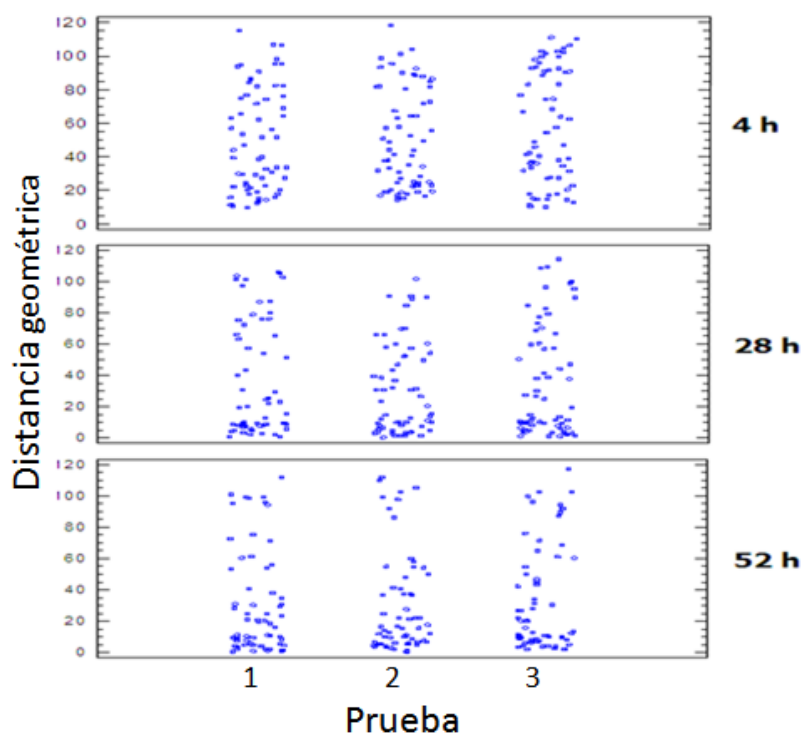
En la tabla 14, si se consideran todas las pruebas, la  $CI_{50-4h}$  fluctuó entre 300 y 600 ppb de Cu. Por su parte, las  $CI_{50-28h}$  y las  $CI_{50-52h}$  variaron entre 75 y 150 ppb (con excepción de la prueba 3). Las curvas dosis-respuesta (inhibición lumínica) de las tres pruebas a 4, 28 y 52 horas de exposición se aprecian en la figura 20. Al comparar los resultados de inhibición lumínica en las tres pruebas durante un mismo periodo de exposición, se observa un comportamiento muy similar.



**Figura 20. Inhibición lumínica en *P. lunula* tratada con Cu en tres pruebas [1(□), 2 (▲) y 3 (●)] y tres periodos de exposición (4, 28 y 52 horas).**

Con el fin de evaluar la repetibilidad del ensayo, se estableció si las diferencias entre los resultados de igual tiempo de exposición eran o no significativas. Para esto se tomaron, los 64 valores de distancia geométrica por prueba (%). El gráfico de dispersión y el resumen estadístico para las pruebas a las 4, 28 y 52 horas de exposición se muestran en la figura 21 y la tabla 15.





**Figura 21. Dispersión de datos de distancia geométrica para las pruebas de toxicidad con Cu a las 4, 28 y 52 horas de exposición.**

**Tabla 15. Resumen estadístico de los resultados de luminiscencia de *P. lunula* tratada con Cu a 4, 28 y 52 horas de exposición.**

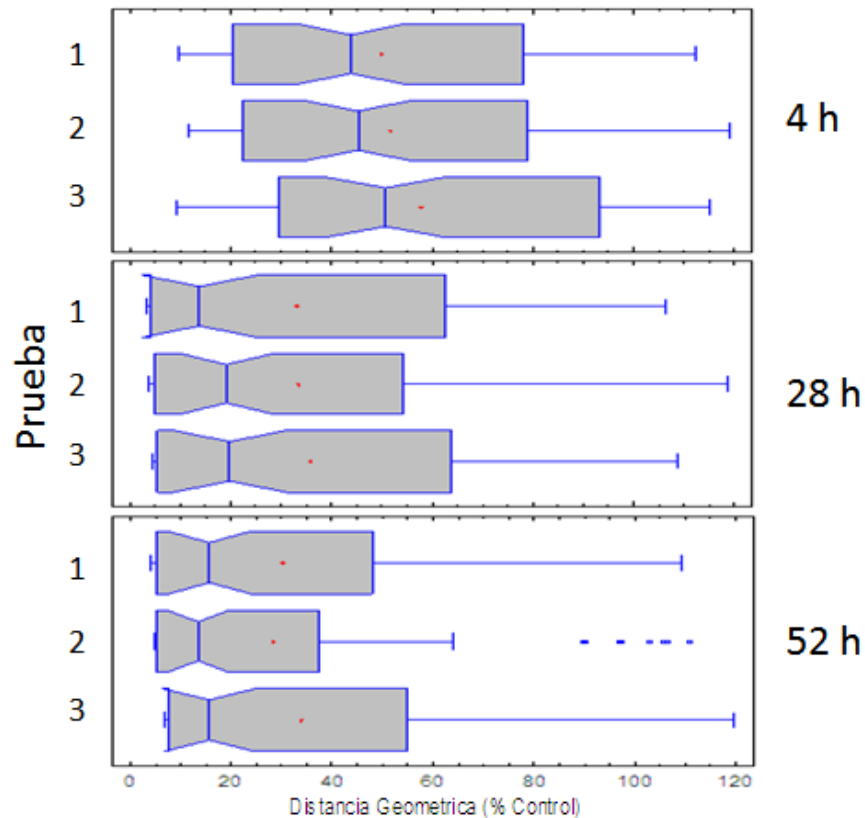
<i>Duración</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Mediana</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>	<i>Sesgo Estándar</i>	<i>Curtosis Estándar</i>	
<b>4 h</b>	Prueba1	64	49,9334	43,845	30,9994	62,0814%	9,88	112,24	102,36	1,33436	-2,07081
	Prueba2	64	51,6486	45,245	30,7278	59,4941%	11,81	119,03	107,22	1,50949	-1,73262
	Prueba3	64	57,6542	50,79	33,4167	57,9605%	9,35	115,05	105,7	0,458679	-2,47876
	<b>Total</b>	<b>192</b>	<b>53,0787</b>	<b>45,275</b>	<b>31,745</b>	<b>59,8074%</b>	<b>9,35</b>	<b>119,03</b>	<b>109,68</b>	<b>1,8937</b>	<b>-3,69235</b>
<b>28 h</b>	Prueba1	64	33,2144	13,795	35,4601	106,761%	3,27	106,13	102,86	2,81544	-1,30382
	Prueba2	64	33,3442	19,16	33,3868	100,128%	3,94	118,46	114,52	3,17578	-0,261567
	Prueba3	64	35,7491	19,82	34,601	96,7885%	4,49	108,6	104,11	2,54864	-1,33319
	<b>Total</b>	<b>192</b>	<b>34,1026</b>	<b>16,245</b>	<b>34,332</b>	<b>100,673%</b>	<b>3,27</b>	<b>118,46</b>	<b>115,19</b>	<b>4,82906</b>	<b>-1,83695</b>
<b>52 h</b>	Prueba1	64	30,2	15,7	32,6763	108,2%	4,04	109,11	105,07	4,06389	0,395929
	Prueba2	64	28,4592	13,465	31,6913	111,357%	4,75	111,01	106,26	4,69188	1,49692
	Prueba3	64	33,9753	15,66	33,7994	99,4822%	6,83	119,71	112,88	3,50427	-0,384612
	<b>Total</b>	<b>192</b>	<b>30,8782</b>	<b>14,305</b>	<b>32,6435</b>	<b>105,717%</b>	<b>4,04</b>	<b>119,71</b>	<b>115,67</b>	<b>6,91963</b>	<b>0,499728</b>

En las figuras de dispersión de datos se evidencia la acumulación progresiva de valores bajos de distancia geométrica con el incremento del tiempo de exposición. Para los tres tiempos evaluados los valores de sesgo estandarizado y curtosis estandarizada están por fuera del rango en que se asume distribución normal. Dado que no se cumplieron los supuestos de parametricidad en los datos, se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para confirmar si existían diferencias en los resultados de luminosidad de las tres pruebas a los mismos periodos de exposición a Cu (Tabla 16). Dado que en las 3 pruebas de Kruskal

Wallis, el valor-P fue mayor a 0,05, se puede concluir con un 95% de confianza que no existen diferencias significativas entre las medianas de luminosidad para cada periodo de exposición en los tres ensayos (Figura 22).

**Tabla 16. Resultados de la prueba de Kruskal Wallis aplicada a los datos de inhibición de luminiscencia de *P. lunula* expuesta a Cu.**

Tiempo (horas)	Prueba	Tamaño de Muestra	Rango Promedio	Estadístico	Valor p
4	1	64	90,4766	2,14006	0,342998
	2	64	94,5703		
	3	64	104,453		
28	1	64	87,2969	3,12069	0,210064
	2	64	97,6719		
	3	64	104,531		
52	1	64	90,2422	4,63056	0,0987385
	2	64	90,5547		
	3	64	108,703		



**Figura 22. Caja y bigotes para pruebas de toxicidad con Cu.**

Los resultados indicaron que las curvas dosis-respuesta entre concentraciones crecientes de Cu y la inhibición lumínica de *P. lunula* son repetibles en pruebas independientes con el mismo tiempo de exposición. Las rectas de la regresión, las ecuaciones y los coeficientes de correlación ( $r$ ) para el cálculo de las  $CI_{50}$  se muestran en las figuras 23, 24 y 25.

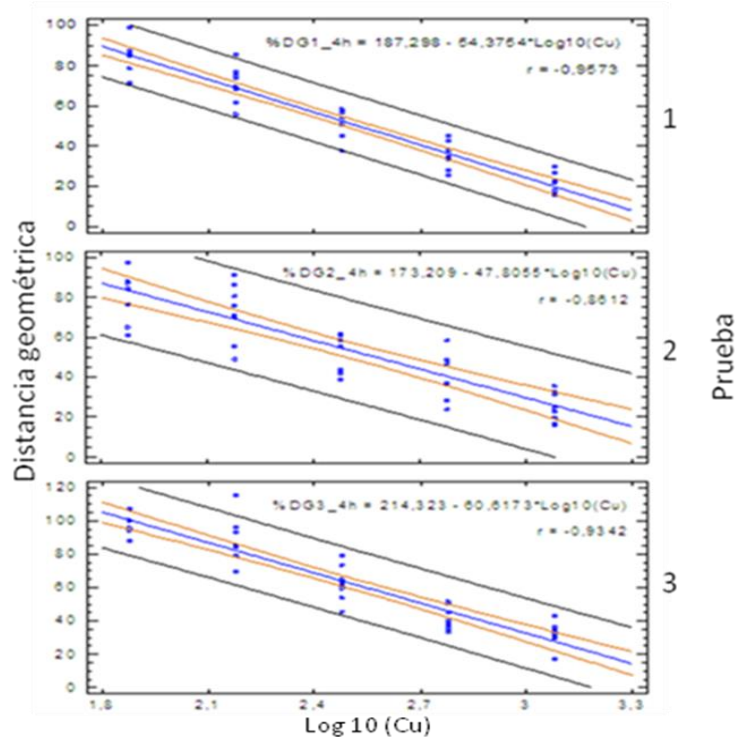


Figura 23. Regresión entre el  $\log_{10}$  de la concentración de Cu y la intensidad lumínica (%) de *P. lunula* para 4 horas de exposición.

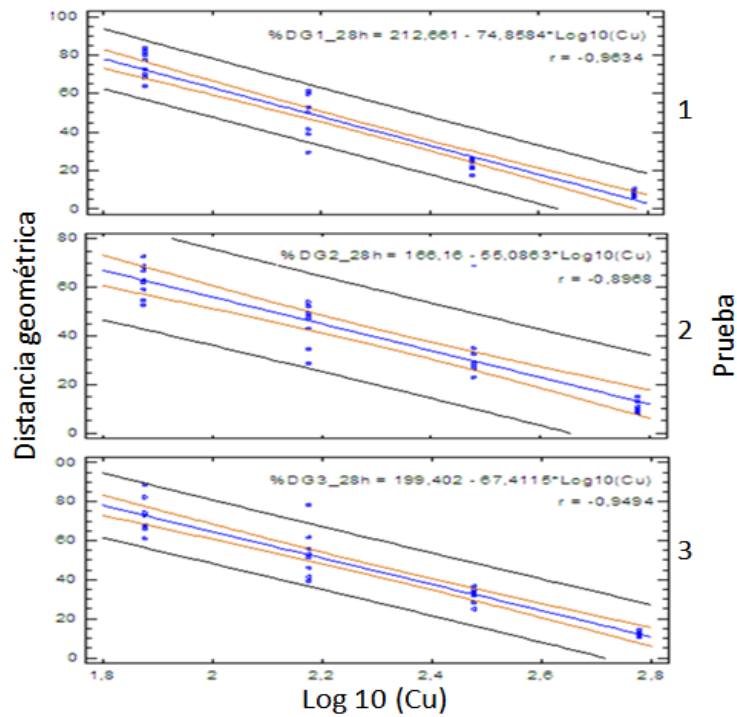
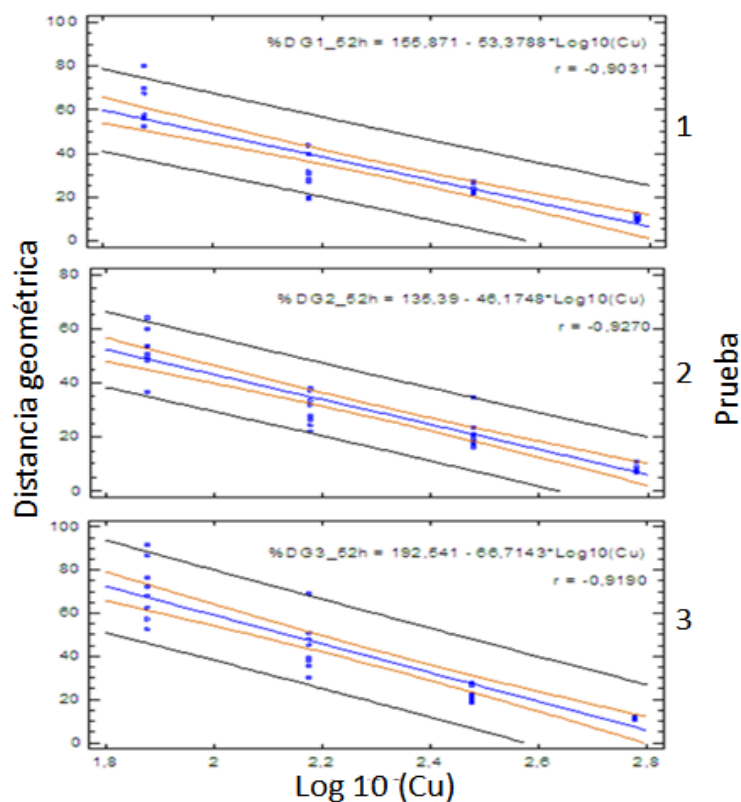


Figura 24. Regresión entre el  $\log_{10}$  de la concentración de Cu y la intensidad lumínica (%) de *P. lunula* para 28 horas de exposición.

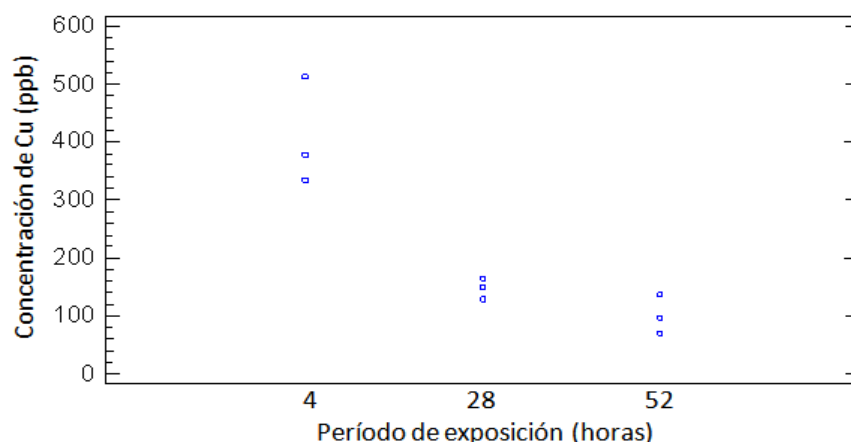


**Figura 25. Regresión entre el  $\log_{10}$  de la concentración de Cu y la intensidad lumínica (%) de *P. lunula* para 52 horas de exposición.**

Las concentraciones inhibitorias medias ( $CI_{50}$ ), obtenidas mediante el análisis de regresión para cada uno de los tres ensayos con Cu en los tres tiempos de exposición evaluados se muestran en la tabla 17. El gráfico de dispersión y las  $CI_{50}$  promedio por periodo de exposición con sus intervalos de confianza se aprecian en la figura 26 y la tabla 18.

**Tabla 17.  $CI_{50}$  del Cu (ppb) sobre *P. lunula* para tres pruebas por periodo de exposición.**

Periodo de exposición								
4 h			28 h			52 h		
1	2	3	1	2	3	1	2	3
334,98	377,85	513,85	148,91	128,44	164,55	96,25	70,68	136,96



**Figura 26. Dispersión de los resultados de las CI<sub>50</sub> de Cu en *P. lunula* para tres periodos de exposición.**

Al promediar los valores de las CI<sub>50</sub> del Cu para cada periodo de exposición, se evidenció una reducción de las CI<sub>50</sub> a medida que se incrementó el tiempo de experimentación.

**Tabla 18. CI<sub>50</sub> promedio del Cu (ppb) sobre *P. lunula* por periodo de exposición.**

Periodo de exposición	N	Media	Intervalos de Confianza	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
4h	3	408,89	176,90 - 640,88	93,3884	22,8393%
28h	3	147,30	102,32 - 192,28	18,1088	12,2938%
52h	3	101,30	18,26 - 184,34	33,427	32,9991%

Dado que los valores-P asociados tanto a los estadísticos de las pruebas de normalidad, como al de la prueba de verificación de varianza (Tablas 19 y 20) fueron en todos los casos mayores a 0,05 se pudo concluir con el 95% de confiabilidad que los datos de las CI<sub>50</sub> provenían de una distribución normal y que la varianza era similar para las CI<sub>50</sub> examinadas a diferentes tiempos.

**Tabla 19. Pruebas de normalidad para las CI<sub>50</sub> del Cu sobre *P. lunula*.**

Periodo de exposición	Estadístico	Valor-P
4h	0,917127	0,442304
28h	0,994072	0,852803
52h	0,982905	0,749571

**Tabla 20. Verificación de la varianza para las CI<sub>50</sub> del Cu sobre *P. lunula*.**

	Prueba	Valor-P
Levene's	1,05376	0,405314

Dado que el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado intra grupos (*Razón-F*) es igual a 24,37 y que el valor-P asociado a dicho cociente es menor que 0,05 (Tabla 21), existe al menos una media de CI<sub>50</sub> significativamente diferente de las otras con un nivel del 95% de confianza y en consecuencia se rechaza la hipótesis nula.

**Tabla 21. ANOVA para las CI<sub>50</sub> del Cu sobre *P. lunula*.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	165163,	2	82581,5	24,37	0,0013
Intra grupos	20333,3	6	3388,89		
Total (Corr.)	185496,	8			

De acuerdo a los resultados de la prueba de rangos múltiples (Tabla 22), los valores medios de CI<sub>50</sub> a las 28 y 52 horas de exposición de *P. lunula* al Cu constituyen un grupo homogéneo. En contraste, se encontraron diferencias significativas, con un nivel del 95,0% de confianza, entre la media de la CI<sub>50</sub> a las 4 y las medias a las 28 y 52 horas (Figura 27)

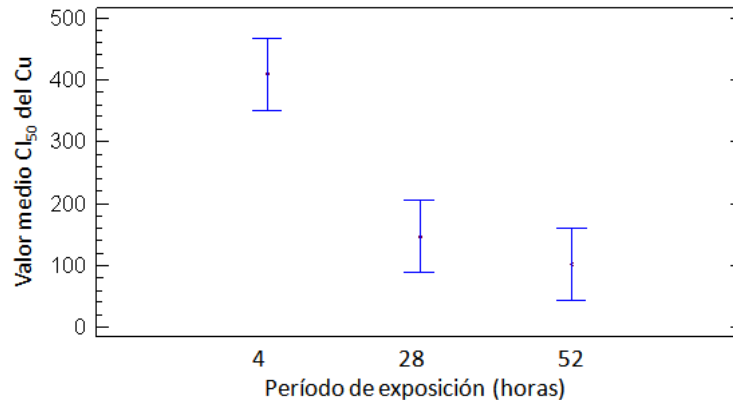
**Tabla 22. Prueba de rangos múltiples para las CI<sub>50</sub> del Cu sobre *P. lunula*.**

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
CI <sub>50</sub> -4h	3	408,893	X
CI <sub>50</sub> -28h	3	147,3	X
CI <sub>50</sub> -52h	3	101,297	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
CI <sub>50</sub> -4h - CI <sub>50</sub> -28h	*	261,593	116,306
CI <sub>50</sub> -4h - CI <sub>50</sub> -52h	*	307,597	116,306
CI <sub>50</sub> -28h - CI <sub>50</sub> -52h		46,0033	116,306

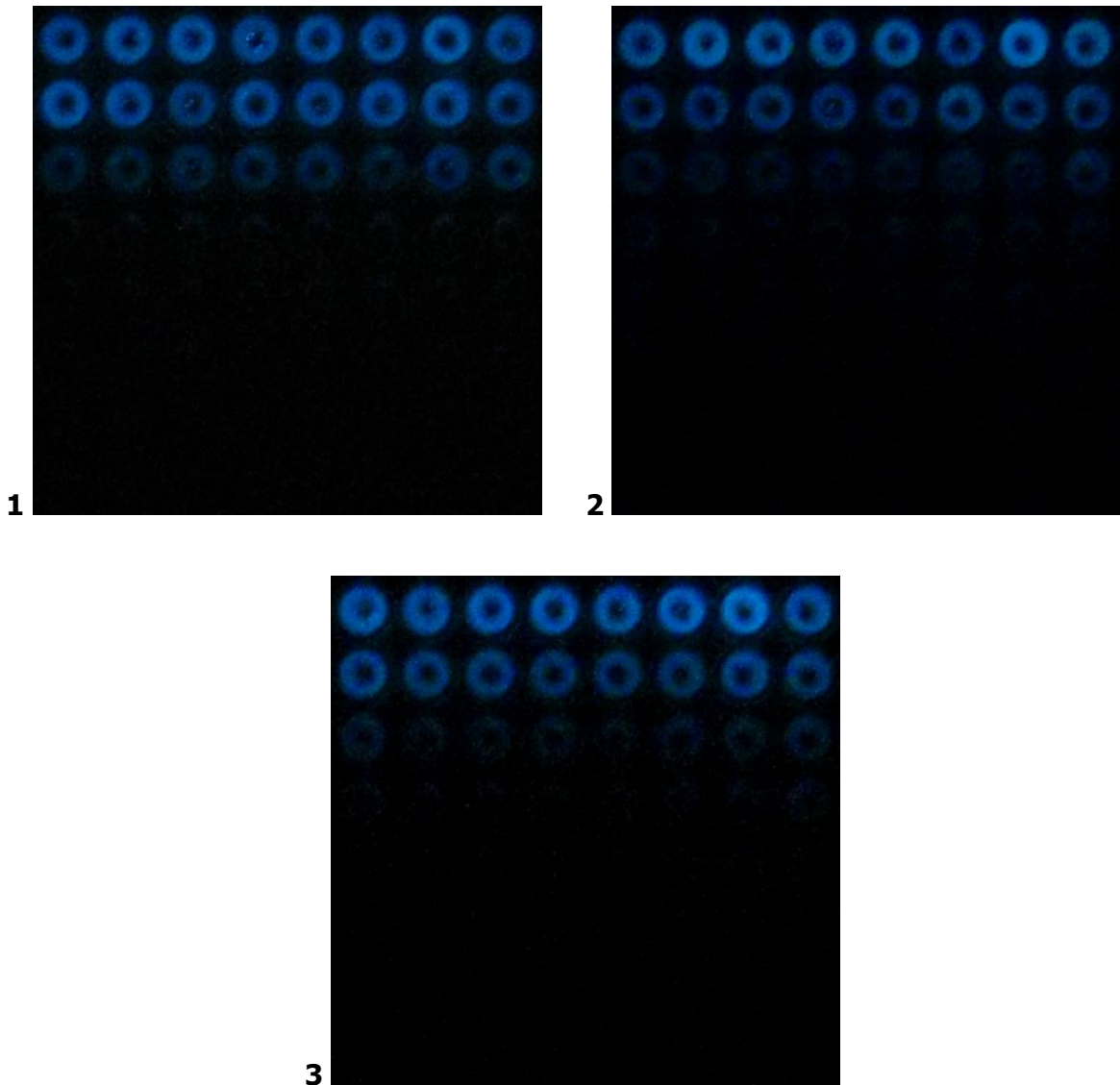
\* indica una diferencia significativa.



**Figura 27. Intervalos de confianza para los valores medios de las CI<sub>50</sub> de Cu sobre *P. lunula*.**

Los resultados anteriores indican que el equipo LumTox y el análisis informático de imagen diseñados en esta investigación fueron adecuados para establecer una CI<sub>50</sub> repetible desde las 4 horas de exposición de *P. lunula* a Cu. Aunque el incremento del periodo de exposición condujo a una reducción de la CI<sub>50</sub> a las 28 y 52 horas, las curvas de inhibición se solapaban considerablemente. En consecuencia, no sería necesario extender el ensayo hasta las 52 horas de exposición. Dados estos resultados, las pruebas de toxicidad con Hg se evaluaron solo a las 4 horas de agregado el metal.

**7.3.2 Toxicidad del mercurio.** Estas pruebas se realizaron por triplicado con un control negativo (fila 1) y siete concentraciones de Hg de la siguiente forma: 40 (fila 2), 80 (fila 3), 160 (fila 4), 320 (fila 5), 640 (fila 6), 1280 (fila 7) y 2560 ppb (fila 8). Las imágenes obtenidas usando el equipo LumTox para las tres pruebas y luego de 4 horas de exposición de *P. lunula* al Hg se muestran en la figura 28.



**Figura 28. Registro fotográfico del comportamiento de la luminosidad de *P. lunula* tratada con Hg en tres pruebas independientes luego de 4 horas de exposición.**

Los datos de distancia geométrica para la intensidad lumínica de *P. lunula* (expresados como porcentaje del control) en cada pozo de las tres pruebas con Hg se muestran en la tabla 23.

**Tabla 23. Distancia geométrica de la intensidad lumínica de *P. lunula* (fracción del control) sometida a Hg en tres pruebas independientes (4 h).**

A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
93,00	102,19	106,04	96,27	99,74	97,18	114,17	91,41
A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2
103,17	97,30	73,83	93,99	89,47	95,75	98,73	79,02
A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3	H3
31,26	33,45	40,05	42,23	42,85	30,55	51,07	45,73
A4	B4	C4	D4	E4	F4	G4	H4
7,76	8,49	10,06	9,48	9,12	9,54	9,22	9,84
A5	B5	C5	D5	E5	F5	G5	H5
5,20	6,02	5,91	6,00	7,22	7,10	6,14	6,02
A6	B6	C6	D6	E6	F6	G6	H6
5,11	5,13	6,00	5,01	5,27	5,23	5,65	5,47
A7	B7	C7	D7	E7	F7	G7	H7
5,04	5,02	4,93	4,91	4,98	4,82	4,55	5,13
A8	B8	C8	D8	E8	F8	G8	H8
4,94	4,61	4,57	4,95	4,83	4,53	4,69	4,51

1

2

A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
96,69	89,66	99,55	100,33	93,33	108,40	122,26	89,76
A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2
72,23	62,07	62,49	54,86	54,55	54,57	72,75	61,13
A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3	H3
25,39	17,10	18,99	19,46	15,34	21,79	21,64	27,81
A4	B4	C4	D4	E4	F4	G4	H4
11,57	9,96	9,87	9,01	9,17	10,79	11,04	15,06
A5	B5	C5	D5	E5	F5	G5	H5
6,84	6,49	6,65	6,83	6,67	7,40	7,79	7,52
A6	B6	C6	D6	E6	F6	G6	H6
6,06	5,73	6,14	6,48	5,91	6,23	6,25	6,10
A7	B7	C7	D7	E7	F7	G7	H7
5,25	5,62	6,19	5,47	5,48	5,97	6,19	5,40
A8	B8	C8	D8	E8	F8	G8	H8
5,46	5,50	5,26	5,60	5,44	5,96	5,34	5,74

3

Los resultados de las tres pruebas fueron concordantes con la inspección visual de la fotografía correspondiente. Las medias de los valores de distancia geométrica (como porcentaje de control) para cada prueba se muestran en la tabla 24.

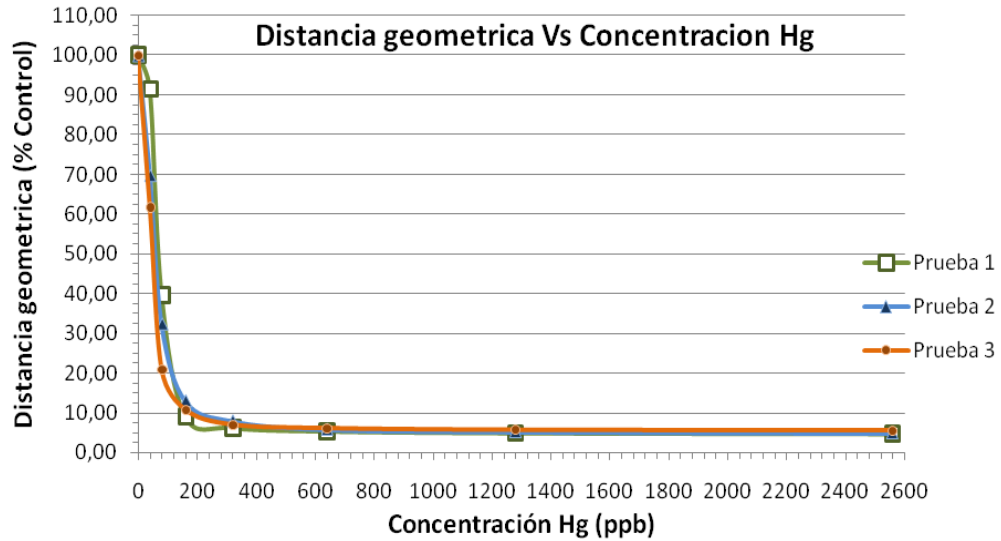
**Tabla 24. Promedio de distancia geométrica (%) para cada concentración de Hg en las tres pruebas.**

Hg (ppb)	Prueba 1 (%DG)*	Prueba 2 (%DG)	Prueba 3 (%DG)
0	100,00	100,00	100,00
40	91,41	69,80	61,83
80	39,65	32,36	20,94
160	9,19	13,01	10,81
320	6,20	7,94	7,02
640	5,36	5,80	6,11
1280	4,92	5,23	5,70
2560	4,70	4,87	5,54

\* %DG = Porcentaje de distancia geométrica

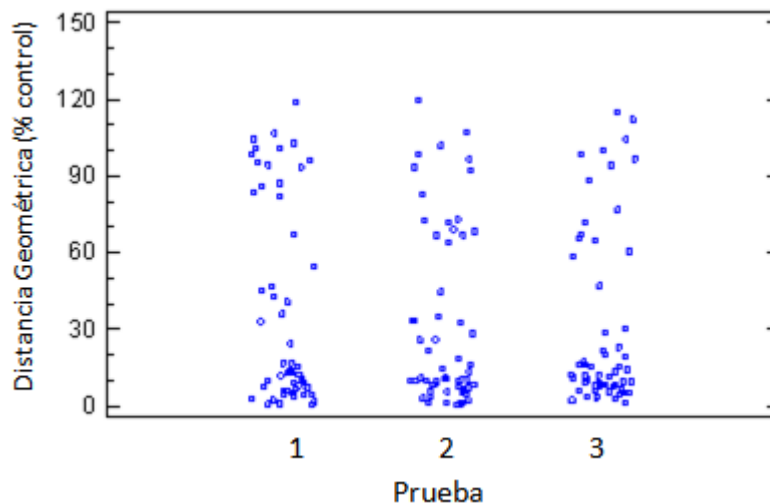


En la tabla 24 la  $CI_{50-4h}$  fluctuó entre 40 y 80 ppb de Hg. Las curvas dosis-respuesta (inhibición lumínica) de las tres pruebas a 4 horas de exposición se aprecian en la figura 29. Al comparar los resultados de inhibición lumínica en las tres pruebas se observa un comportamiento muy similar.



**Figura 29. Inhibición lumínica en *P. lunula* tratada con Hg en tres pruebas luego de 4 horas de exposición.**

Con el fin de evaluar la repetibilidad del ensayo, se estableció si las diferencias entre los resultados eran o no significativas. Para esto, se tomaron los 64 valores de distancia geométrica por prueba (%). El gráfico de dispersión y el resumen estadístico para las pruebas a las 4 horas de exposición se muestran en la figura 30 y la tabla 25.



**Figura 30. Dispersión de datos para las pruebas de toxicidad con Hg (4 h)**

**Tabla 25. Resumen estadístico para las pruebas de toxicidad con Hg (4 h)**

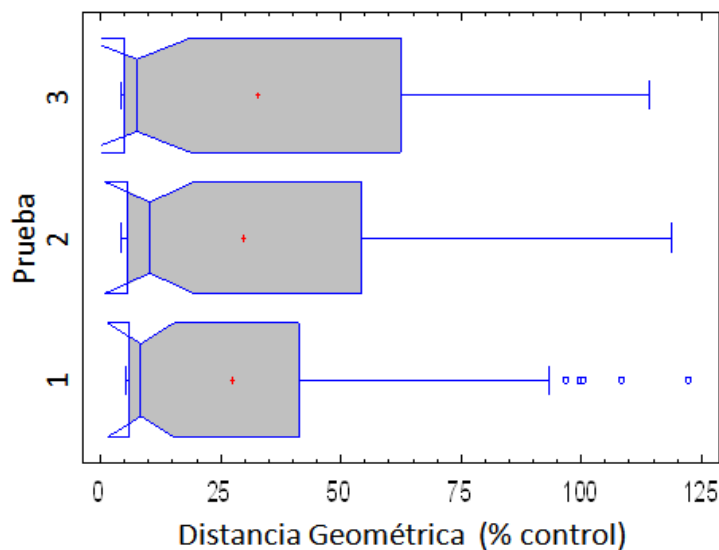
Prueba	N	Media	Mediana	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo Estándar	Curtosis Estándar
1	64	32,6789	7,49	38,6572	118,294%	4,51	114,17	109,66	3,25296	-1,2459
2	64	29,8772	10,16	34,2284	114,564%	4,42	118,7	114,28	3,94073	0,012297
3	64	27,2434	8,4	33,354	122,429%	5,25	122,26	117,01	4,7583	1,1953
<b>Total</b>	<b>192</b>	<b>29,9332</b>	<b>8,75</b>	<b>35,373</b>	<b>118,173%</b>	<b>4,42</b>	<b>122,26</b>	<b>117,84</b>	<b>6,73611</b>	<b>-0,441119</b>

En la figura de dispersión de datos se evidencia la acumulación de valores bajos de distancia geométrica, debido a que la mitad de los datos (filas 5, 6, 7 y 8) presentaron valores por debajo del 10 % de la respuesta lumínica de los controles. Para las tres pruebas evaluadas los valores de sesgo estandarizado y curtosis estandarizada están por fuera del rango en que se asume distribución normal (Tabla 25). Dado que no se cumplieron los supuestos de parametricidad en los datos, se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para confirmar si existían diferencias en los resultados de luminosidad de las tres pruebas a 4 horas de exposición a Hg (Tabla 26). Dado que en la prueba de Kruskal Wallis, el valor-P fue mayor a 0,05, se puede concluir con un 95% de confianza que no existen diferencias significativas entre las medianas de luminosidad para las tres pruebas luego de 4 horas de exposición (Figura 31).

**Tabla 26. Resultados de la prueba de Kruskal Wallis aplicada a los datos de inhibición de luminiscencia de *P. lunula* expuesta a Hg (4 h).**

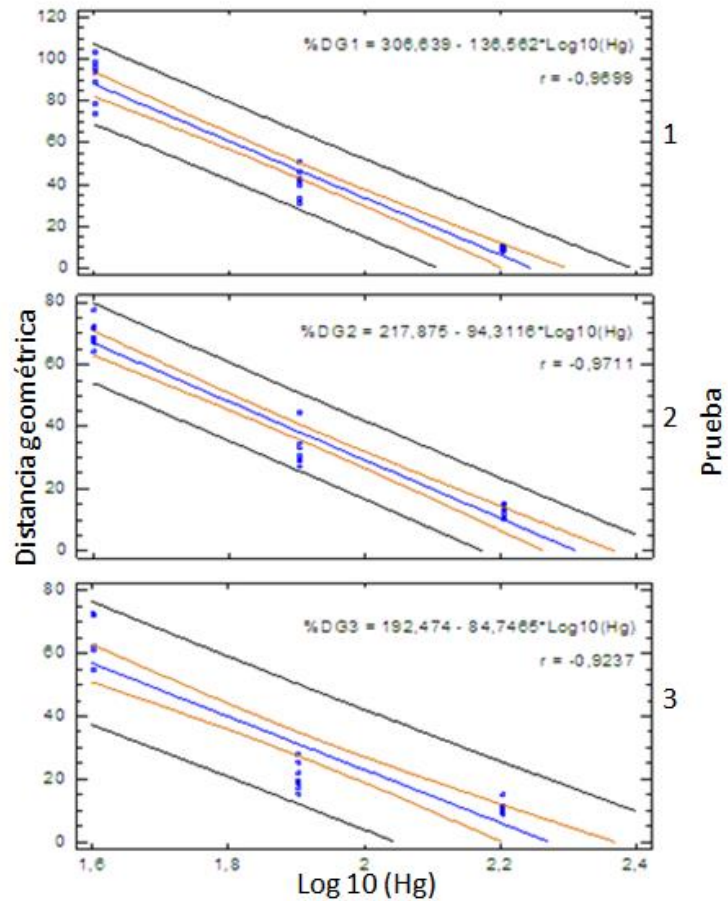
Prueba	Tamaño de Muestra	Rango Promedio
1	64	90,2734
2	64	97,4844
3	64	101,742

Estadístico = 1,39317 Valor-P = 0,498283



**Figura 31. Caja y bigotes para pruebas de toxicidad con Hg (4 horas)**

Los resultados indicaron que las curvas dosis-respuesta entre concentraciones crecientes de Hg y la inhibición lumínica de *P. lunula* son repetibles en pruebas independientes luego de 4 horas de exposición. Las rectas de la regresión, las ecuaciones y los coeficientes de correlación (r) para el cálculo de las CI<sub>50</sub> se muestran en la figura 32.



**Figura 32. Regresión entre el log<sub>10</sub> de la concentración de Hg y la intensidad lumínica (%) de *P. lunula* para 4 horas de exposición.**

Las concentraciones inhibitorias medias (CI<sub>50</sub>), obtenidas mediante el análisis de regresión para cada uno de los tres ensayos con Hg, así como la CI<sub>50</sub> promedio con sus intervalos de confianza se aprecian en la tabla 27.

**Tabla 27. CI<sub>50</sub> promedio del Hg (ppb) sobre *P. lunula* luego de 4 horas de exposición.**

Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	CI <sub>50</sub> Promedio	Intervalos de confianza	Desviación estándar	Coefficiente de variación
75,73	60,26	47,99	61,33	26,80 - 95,86	13,9007	22,6667%

Los resultados anteriores indican el equipo LumTox y el análisis informático de imagen diseñados en esta investigación fueron adecuados para establecer una CI<sub>50</sub> repetible luego de 4 horas exposición de *P. lunula* a Hg.

**7.3.3 Comparación entre las pruebas de toxicidad con Cu y Hg tras 4 horas de exposición.** Con el fin de comparar las diferencias en la sensibilidad de *P. lunula* al Cu y Hg, se tomaron los valores promedio de distancia geométrica para tres pruebas luego de 4 horas de exposición, expresando la concentración del metal en  $\mu\text{M}$  (Tabla 28). Las CI<sub>50</sub>-4h para los dos metales se observan en la tabla 29. La comparación entre las curvas de inhibición se aprecia en la figura 33.

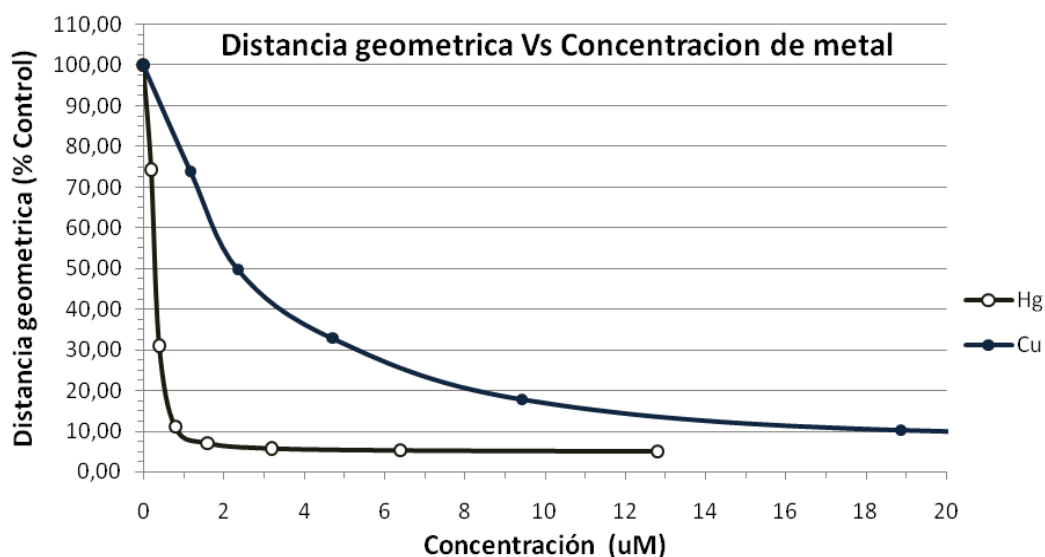
**Tabla 28. Promedio de distancia geométrica (%) de la intensidad lumínica en *P. lunula* para cada concentración de Cu y Hg ( $\mu\text{M}$ ) tras 4 horas de exposición.**

Hg ( $\mu\text{M}$ )	DG	Cu ( $\mu\text{M}$ )	DG
0	100	0	100
0,2	74,34	1,18	73,85
0,4	30,99	2,36	49,73
0,8	11,00	4,72	32,85
1,6	7,05	9,44	17,88
3,2	5,76	18,88	10,32
6,4	5,28	37,76	9,32
12,8	5,04	75,52	8,31

**Tabla 29. CI<sub>50</sub>-4h promedio de Cu y Hg ( $\mu\text{M}$ ) sobre *P. lunula*.**

Prueba de toxicidad	CI <sub>50</sub> -4h ( $\mu\text{M}$ )	Intervalos de confianza
Cu	6,43	2,78 - 10,08
Hg	0,57	0,25 - 0,89

Se encontró que para *P. lunula* la curva de inhibición de la bioluminiscencia quedó establecida para Hg a concentraciones muy inferiores en relación a la misma curva para Cu. De hecho, mientras que la estabilización de la curva respecto al eje X para Hg se alcanzaba desde aproximadamente 1,60  $\mu\text{M}$ , en el caso del Cu se requirió una concentración de aproximadamente 19  $\mu\text{M}$  para iniciar dicha estabilización. Adicionalmente, la pendiente de la curva de inhibición lumínica fue mucho mayor para el Hg que para el Cu. A pesar de que la primera concentración del metal en ambos casos produjo una respuesta cercana al 74% de los respectivos controles, las concentraciones siguientes condujeron a reducciones mayores en la respuesta lumínica en el ensayo con Hg. Al comparar los valores  $\mu\text{M}$  de las CI<sub>50</sub>-4h se estableció que *P. lunula* se mostró aproximadamente once veces más sensible al Hg que al Cu.



**Figura 33. Inhibición lumínica promedio en *P. lunula* para las pruebas de toxicidad con Cu y Hg tras 4 horas de exposición.**

**7.3.4 Comparación de los resultados obtenidos con otras investigaciones de toxicidad del Cu y Hg en microorganismos bioluminiscentes.** Las referencias bibliográficas a bioensayos con organismos luminiscentes se refieren principalmente a pruebas con el sistema Microtox® usando la bacteria marina *Vibrio fischeri*. Este es un sistema de alerta temprana altamente estandarizado y muy difundido a nivel internacional. Por otra parte, las referencias sobre el uso de dinoflagelados bioluminiscentes en pruebas de toxicidad son aun escasas. En algunas investigaciones se evaluaron los efectos del Cu y/o Hg sobre las especies de dinoflagelados bioluminiscentes: *Pyrocystis lunula*, *Pyrocystis noctiluca* y *Ceratocorys horrida* (Robayo, 1999); (Heimann et al., 2002); (Rosen et al., 2008). En la investigación de Rosen et al., además se comparó la respuesta lumínica de los dinoflagelados con la respuesta de la bacteria luminiscente *Vibrio fischeri*. En la tabla 30 se comparan los valores de las CI<sub>50</sub> de varios estudios en los cuales se trataron microorganismos luminiscentes con Cu y/o Hg.

**Tabla 30. Comparación de las CI<sub>50</sub> (ppm) obtenidas en pruebas de toxicidad con Cu y Hg en microorganismos luminiscentes.**

Metal	CI <sub>50</sub> -4h <i>P. lunula</i> <sup>1</sup>	CI <sub>50</sub> -28h <i>P. lunula</i> <sup>1</sup>	CI <sub>50</sub> -4h <i>P. lunula</i> <sup>2</sup>	CI <sub>50</sub> -24h <i>P. lunula</i> <sup>3</sup>	CI <sub>50</sub> -24h <i>P. noctiluca</i> <sup>4</sup>	CI <sub>50</sub> -24h <i>C. horrida</i> <sup>4</sup>	CI <sub>50</sub> -15min <i>V. fischeri</i> <sup>4</sup>	Limite en agua potable <sup>5</sup>
<b>Cu</b>	0,409 ± 0,232	0,147 ± 0,045	0,061 ± 0,006	0,310 ± ?	0,185 ± 0,101	0,166 ± 0,016	0,397 ± 0,030	1,300
<b>Hg</b>	0,061 ± 0,035	--	--	--	0,010 ± 0,001	0,021 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,093 ± 0,000	0,002

<sup>1</sup> Esta investigación usando el equipo LumTox.

<sup>2</sup> Heimann et al. (2002) usando el equipo Tox-Box

<sup>3</sup> Robayo. (1999) usando el equipo Qwiklite

<sup>4</sup> Rosen et al. (2008) usando los equipos Qwiklite y Microtox.

<sup>5</sup> USEPA

Mientras que en el presente estudio, la  $CI_{50}$  luego de 4 horas de exposición de *P. lunula* LB-2271 a Cu fue  $0,409 \pm 0,232$  ppm, Heimann et al (2002) reportaron un valor  $CI_{50}$  de  $0,061 \pm 0,006$  ppm en la cepa T-33 de esta misma especie durante igual exposición. Estos resultados indican una diferencia de casi siete veces en la  $CI_{50}$  entre las dos pruebas, debido a la variabilidad de respuesta entre cepas. La cepa T-33 fue seleccionada especialmente para ensayos de toxicidad e incluso, se encuentra protegida por patente argumentando una sensibilidad mayor que otras cepas de la misma especie. Otra posible causa de la diferencia en los resultados estaría en la densidad celular, ya que mientras en esta investigación se emplearon 1000 cel/ml en la investigación de Heimann et al. (2002) solo se consideraron 100 cel/ml, y se ha demostrado que la densidad celular afecta la sensibilidad de los bioensayos con microalgas, ya que para un número mayor de células la cantidad del tóxico por célula disminuye (Debelius et al., 2009).

Al comparar la  $CI_{50}$ -4h para el Cu en *P. lunula* LB-2271 con la  $CI_{50}$  para el mismo metal en *Vibrio fischeri*, se encontró que los valores son prácticamente idénticos, evidenciando un nivel similar de sensibilidad de estos microorganismos a este metal. Al extender el tiempo de exposición de *P. lunula* LB-2271 al Cu hasta las 28 horas se obtuvo una  $CI_{50}$  de  $0,147 \pm 0,045$  ppm, ligeramente menor que las  $CI_{50}$ -24h para los dinoflagelados de referencia evaluados en las investigaciones de Robayo y Rosen et al. ( $0,166 - 0,310$  ppm) por lo que las sensibilidades de los microorganismos estarían en un nivel equiparable. Adicionalmente, las  $CI_{50}$  obtenidas tanto a las 4 como 28 horas para el Cu, son inferiores al nivel máximo de referencia de la USEPA para agua potable.

Por otra parte, la  $CI_{50}$ -4h calculada para el Hg fue  $0,061 \pm 0,035$  ppm, valor inferior en relación a la  $CI_{50}$  para el mismo metal en *Vibrio fischeri*, pero superior a las  $CI_{50}$  de los dinoflagelados *Pyrocystis noctiluca* y *Ceratocorys horrida*. Estas diferencias están asociadas al tiempo de exposición de estas microalgas al Hg, en la investigación de Rosen et al. (2008) fue 24 horas y en este estudio 4 horas y como se observó para el Cu, a mayor tiempo de contacto con el metal, el efecto se incrementa. Finalmente, se observó que las  $CI_{50}$  de Hg sobre la especie evaluada se ubicó por encima del nivel máximo de referencia de la USEPA para agua potable.

## CONCLUSIONES

- El medio sintético para dinoflagelados (SDM), es adecuado para mantener cultivos de *Pyrocystis lunula*, pero no es apropiado para estimular el crecimiento de esta especie cuando se encuentra en bajas densidades celulares y en fase de adaptación, debido a que es preparado con agua de mar artificial y con pocos metales traza.
- El medio L1 es óptimo para cultivos de *P. lunula*, ya que la estimulación del crecimiento fue muy superior, dadas sus mayores capacidades nutricionales al ser preparado con agua de mar natural y con metales traza adicionales como selenio, molibdeno y vanadio.
- El control de las condiciones de iluminación, pH, temperatura, salinidad y fotoperiodo son clave para el mantenimiento óptimo de la cepa, así mismo, es indispensable utilizar métodos axénicos e implementos estériles para el cultivo de *P. lunula*, además, el uso de recipientes sellados y de gran volumen (500 ml) es útil para evitar contaminación por otros microorganismos.
- El mantenimiento de los cultivos de *P. lunula*, una vez alcanzada la densidad celular máxima es un proceso sencillo; No obstante, para mantener un suministro constante de células para los bioensayos, es conveniente que la duplicación de los cultivos se haga con una dilución baja (1:1) en medio de cultivo fresco, con el fin de evitar que las células permanezcan mucho tiempo en fase de adaptación.
- El sistema de medición LumTox, diseñado y construido durante esta investigación, probó tener los elementos suficientes para obtener imágenes digitales con alta calidad de la bioluminiscencia de *P. lunula* en microplatos agitados mecánicamente.
- El software empleado para el procesamiento y análisis de las imágenes capturadas con el equipo LumTox demostró ser útil para extraer información cuantitativa a partir de la composición del color en los píxeles de cada imagen. Así mismo, los resultados demostraron que la distancia geométrica entre dicha composición y el punto de origen del espacio de color RGB es una medida válida de la intensidad lumínica.
- En los microplatos, *Pyrocystis lunula* resiste muy bien altas velocidades de agitación. Dado que la intensidad lumínica de los dinoflagelados depende directamente del estímulo mecánico, una agitación orbital cercana a 10000 rpm es la más indicada para realizar pruebas de toxicidad en microplatos con este organismo.
- La respuesta lumínica de *P. lunula* sin ninguno de los dos metales, en microplatos agitados a la velocidad indicada y fotografiados con el equipo LumTox fue homogénea, y no presentó diferencias importantes en los valores del análisis de imagen entre las filas de pozos centrales y las de pozos periféricos.

- La intensidad de la bioluminiscencia de *P. lunula* se afecta directamente por su densidad celular, estos cambios son repetibles en pruebas independientes. La relación ruido/señal en la imagen aumenta a medida que desciende la densidad celular. De acuerdo a los resultados de las pruebas con diferentes densidades de *P. lunula*, valores entre 500 y 2000 cel/ml son los más indicados para la ejecución de bioensayos con el equipo LumTox.
- Los ensayos con Cu y Hg en microplatos, con *P. lunula*, muestran una relación directa entre la inhibición de la bioluminiscencia y la concentración del metal, y permite cuantificar una  $CI_{50}$  reproducible desde las 4 horas de exposición.
- Los valores de las  $CI_{50}$  de Cu y Hg obtenidas con el sistema diseñado en esta investigación, son muy cercanas a los valores de  $CI_{50}$  determinados, para estos metales con bacterias y dinoflagelados bioluminiscentes. Este hecho, valida el uso del equipo y análisis informático del sistema LumTox para el monitoreo ambiental de metales pesados y posiblemente otros tóxicos
- El modelo propuesto es un sistema de alerta temprana de bajo costo, requiere bajos volúmenes de muestra, permite evaluar un gran número de muestras simultáneamente y generar bajos volúmenes de desechos.



## BIBLIOGRAFÍA

- ASTM.** 2004. Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests with Microalgae. E1218-04.
- ASTM.** 1997. Standard Guide for Conducting Toxicity Tests with Bioluminescent Dinoflagellates. E 1924-97
- Castillo F, Viscaino Z.** 1992. Los indicadores biológicos del fitoplancton y su relación con el fenómeno de El Niño 1991 – 1992 en el Pacífico Colombiano. Memorias VIII Seminario Nacional Ciencias y Tecnologías del Mar. Santa Marta, Colombia. 732-740 p.
- Castillo G.** 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. 1er ed. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. Ottawa, 172 p.
- Cayuela ML, Millner P, Slovin J, Roig A.** 2007. Duckweed (*Lemna gibba*) growth inhibition bioassay for evaluating the toxicity of olive mill wastes before and during composting. Chemosphere, 68:1985-1991.
- Cordero J, Guevara M, Morales E, Lodeiros C.** 2005. Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). Revista de Biología Tropical, 53:325-330.
- Craig JM, Klerks PL, Heimann K, Waits JL.** 2003. Effects of salinity, pH and temperature on the re-establishment of bioluminescence and copper or SDS toxicity in the marine dinoflagellate *Pyrocystis lunula* using bioluminescence as an endpoint. Environmental Pollution 125:267-275.
- Cussatlegras AS, Gal PL.** 2005. Dinoflagellate bioluminescence in response to mechanical stimuli in water flows. Nonlinear Processes in Geophysics, 12:337-343.
- Dale B.** 2001. Marine dinoflagellate cysts as indicators of eutrophication and industrial pollution: a discussion. The Science of The Total Environment, 264:235-240.
- Debelius B, Forja JM, DelValls A, Luvia LM.** 2009. Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72:1503-1513.
- Doadrio AL.** 2004. Ecotoxicología y acción tóxica del mercurio. Anales Real Academia Nacional de Farmacia. 70:933-959.
- Dunlap JC, Hastings JW.** 1981. Biochemistry of dinoflagellate bioluminescence: purification and characterization of dinoflagellate luciferin from *Pyrocystis lunula*. Biochemistry, 20:983-989.

**Eisentraeger A, Dott W, Klein J, Hahn S.** 2003. Comparative studies on algal toxicity testing using fluorometric microplate and Erlenmeyer flask growth-inhibition assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54:346–354.

**Gabrielson J, Kühn I, Colque-Navarro P, Hart M, Iversen A, McKenzie D, Möllby R.** 2003. Microplate-based microbial assay for risk assessment and (eco)toxic fingerprinting of chemicals. *Analytica Chimica Acta*, 485:121–130.

**Gaona X.** 2004. El mercurio como contaminante global. Tesis (Doctorado en Química). Departamento de Química. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. 246 p.

**Gómez LM, Ramírez Z.** 2004. Microalgas como biomonitores de contaminación. *Revista Cubana de Química*, 16:34-48.

**Hackett JD, Anderson DM, Erdner DL, Bhattacharya D.** 2004. Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment. *American Journal of Botany*, 91:1523-1534.

**Heimann K, Matuszewski JM, Stiffey AV, Klerks PL.** 2000. Bioluminescence in the marine dinoflagellate *Pyrocystis lunula*. *Journal of Phycology*, 36:29-29.

**Heimann K, Matuszewski JM, Klerks PL.** 2002. Effects of metals and organic contaminants on the recovery of bioluminescence in the marine dinoflagellate *Pyrocystis lunula* (Dinophyceae). *Journal of Phycology*, 38:482–492.

**Hirmann D, Loibner AP, Braun R, Szolar OH.** 2007. Applicability of the bioluminescence inhibition test in the 96-well microplate format for PAH-solutions and elutriates of PAH-contaminated soils. *Chemosphere*, 67:1236–1242.

**Horvatic J, Persic V.** 2007. The effect of Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup> on the growth rate of marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin: microplate growth inhibition test. *Bull Environ Contam Toxicol*, 79:494–498.

**Hsieh CY, Tsai MH, Ryan DK, Pancorbo OC.** 2004. Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fisheri* in the Microtox chronic toxicity test. *The Science of the Total Environment*, 320:37–50.

**Ismail M, Phang SM, Tong SL, Brown MT.** 2002. A modified toxicity testing method using tropical marine microalgae. *Environmental Monitoring and Assessment*, 75:145–154.

**Kimura K, Kikuchi S, Yamasaki SI.** 1999. Accurate root length measurement by image analysis. *Plant and Soil*, 216:117–127.

**Knaust R, Urbig T, Li L, Taylor W, Hastings JW.** 1998. The circadian rhythm of bioluminescence in *Pyrocystis* is not due to differences in the amount of luciferase: a comparative study of three bioluminescent marine dinoflagellates. *Journal of Phycology*, 34:167–172.

- Lapota D, Moskowitz GJ, Rosenberger DE, Grovhoug JG.** 1993. The use of stimutable bioluminescence from marine dinoflagellates as a means of detecting toxicity in the marine environment. *Environmental Toxicology and Risk Assessment*. 2nd Vol. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Lapota D, Robayo A, Liao C, Bjorndal B.** 2007. The use of bioluminescent dinoflagellates as an environmental risk assessment tool. *Marine Pollution Bulletin*, 11p.
- Lee JH, Mitchell RJ, Kim BC, Cullen DC, Gu MB.** 2005. A cell array biosensor for environmental toxicity analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 21:500–507.
- Levy JL, Stauber JL, Jolley DF.** 2007. Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Science of the Total Environment*, 387:141–154.
- Mendiola BR, Ochoa N, Gomez O.** 1982. Los dinoflagelados como indicadores biológicos de masas de agua – Fenómeno “El Niño”. *Manual of methods in aquatic environment research*. FAO Tech Pap. 131 p.
- Millán de Kuhn R, Streb C, Breiter R, Richter P, Neeße T, Hader DP.** 2006. Screening for unicellular algae as possible bioassay organisms for monitoring marine water samples. *Water Research*, 40:2695–2703.
- Morquecho L, Lechuga-Devéze CH.** 2004. Seasonal occurrence of planktonic dinoflagellates and cyst production in relationship to environmental variables in subtropical Bahía Concepción, Gulf of California. *Botanica Marina*, 47(4):313-322.
- Niemi G, Wardrop D, Brooks R, Anderson S, Brady V, Paerl H, Rakocinski C, Brouwer M, Levinson B, McDonald M.** 2004. Rationale for a New Generation of Indicators for Coastal Waters. *Environ Health Perspect*, 112(9):979–986.
- Ninomiya K, Tsushima Y, Kino-Oka M, Taya M.** 2003. An automatic image analyzing system for evaluation of elongating behavior of plant hairy roots exposed to herbicidal stimuli. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(I):98-101.
- Okamoto OK, Shao L, Hastings JW, Colepicolo P.** 1999. Acute and chronic effects of toxic metals on viability, encystment and bioluminescence in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 123(C):75–83.
- Paixao SM, Silva L, Fernandes A, O’Rourke K, Mendonca E, Picado A.** 2008. Performance of a miniaturized algal bioassay in phytotoxicity screening. *Ecotoxicology*, 17:165–171.

**Peña V, Pinilla GA.** 2002. Composición distribución y abundancia de la comunidad fitoplanctónica de la ensenada de Utría Pacífico Colombiano. *Revista de biología marina y oceanografía*, 37(1):67-81.

**Radi T, Pospelova V, Vernal A, Barrie JV.** 2007. Dinoflagellate cysts as indicators of water quality and productivity in British Columbia estuarine environments. *Marine Micropaleontology*, 62(4):269-297.

**Ramírez DG, Giraldo A, Tovar J.** 2006. Producción primaria, biomasa y composición taxonómica del fitoplancton costero y oceánico en el Pacífico Colombiano. *Investigaciones Marinas*, 34(2):211-216.

**Ridder GM, Stuard SB, Kerckaert GA, Cody DB, LeBoeuf RA, Isfort RJ.** 1997. Computerized image analysis of morphologically transformed and nontransformed Syrian hamster embryo (SHE) cell colonies: application to objective SHE cell transformation assay scoring. *Carcinogenesis*, 18:1965–1972.

**Robayo MA.** 1999. Determinación de la potencialidad de las algas dinoflageladas bioluminiscentes como bioindicadoras en estudios de detección de contaminantes. Tesis (Biol. Mar.) Fac. Biología Marina. U.J.T.L. Santa Fe de Bogotá. 145 p.

**Rosen G, Osorio-Robayo A, Rivera-Duarte I, Lapota D.** 2008. Comparison of bioluminescent dinoflagellate (QwikLite) and bacterial (Microtox) rapid bioassays for the detection of metal and ammonia toxicity. *Arch Environ Contam Toxicol*, 54:606–611.

**Saetre MM, Dale B, Abdullah MI, Saetre GP.** 1997. Dinoflagellate cysts as potential indicators of industrial pollution in a Norwegian Fjord. *Marine Environmental Research*, 44(2):167-189.

**Sakai Y, Shoji R, Mishima Y, Sakoda A, Sukumi M.** 2000. Rapid and sensitive neurotoxicity test based on the morphological changes of PC12 cells with simple computer-assisted image analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(1):20-24.

**Satoh A, Vudikariab LQ, Kuranoa N, Miyachi S.** 2005. Evaluation of the sensitivity of marine microalgal strains to the heavy metals, Cu, As, Sb, Pb and Cd. *Environment International*, 31:713–722.

**Silva JD, Torres A.** 1992. Estudio cualitativo y semicuantitativo de los dinoflagelados tecados del noroeste de la Guajira (Puerto estrella – Punta espada) Caribe Colombiano. Tesis (Biol. Mar.) Fac. Biología Marina. U.J.T.L. Santa Fe de Bogotá. 106 p.

**Swift E, Taylor IW.** 1967. Bioluminescence and chloroplast movement in the dinoflagellate *Pyrocystis lunula*. *Journal of Phycology*, 3:77-84.

- Swift E, Biggley WH, Seliger HH.** 1973. Species of oceanic dinoflagellates in genera *Dissodinium* and *Pyrocystis* – interclonal and interspecific comparisons of color and photon yield of bioluminescence. *Journal of Phycology*, 9:420-426.
- Swift E, Meunier V.** 1976. Effects of light intensity on division rate, stimutable bioluminescence and cell size of the oceanic dinoflagellates *Dissodinium lunula*, *Pyrocystis fusiformis* and *P. Noctiluca*. *Journal of Phycology*, 12:14-22.
- Torres VA.** 2004. Comparación de la distribución temporal de comunidades fitoplanctónicas de diatomeas y dinoflagelados en la bahía de Tumaco (Pacífico Colombiano) Entre un año afectado por el fenómeno de el niño y uno normal. Tesis (Ecología) Fac. Estudios ambientales. Universidad Javeriana. Santa Fe de Bogotá.
- Vinebrooke RD, Leavitt PR.** 1999. Phytobenthos and Phytoplankton as Potential Indicators of Climate Change in Mountain Lakes and Ponds: A HPLC-Based Pigment Approach. *Journal of the North American Benthological Society*, 18(1):15-33
- Wilson T, Hastings JW.** 1998. Bioluminescence. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 14:197-230.
- Yap CK, Ismail A, Omar H, Tan SG.** 2004. Toxicities and tolerances of Cd, Cu, Pb and Zn in a primary producer (*Isochrysis galbana*) and in a primary consumer (*Perna viridis*). *Environment International*, 29:1097–1104.
- Yoshioka Y, Iwata H, Ohsawa R, Ninomiya S.** 2004. Quantitative evaluation of flower colour pattern by image analysis and principal component analysis of *Primula sieboldii* E. Morren. *Euphytica* 139: 179–186.