

# EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE *Ulva compressa* A CONCENTRACIONES DE CADMIO Y ARSÉNICO, Y SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

## EVALUATION OF THE RESISTANCE OF *Ulva compressa* TO CONCENTRATIONS OF CADMIUM AND ARSENIC, AND ITS ANTIOXIDANT CAPACITY.

Rocío Barra • Francisca Bascuñán  
 Profesora Guía: Roxana Nahuelcura  
 Asesor Científico: Alberto González  
 Liceo N° 1 Javiera Carrera • Santiago  
 roxananahuelcura@liceo1.cl

### Resumen

La contaminación de aguas por metales pesados representa un problema a nivel mundial, debido a lo tóxico que son para el medio ambiente. El cadmio y el arsénico son metales pesados contaminantes de las aguas, principalmente, por la actividad minera en el norte del país. Ante este problema y con la intención de generar un método de fitorremediación, es que la investigación tiene por propósito estudiar si el alga *Ulva compressa* es capaz de resistir la contaminación de metales pesados del norte del país y fitorremediar las aguas. A partir de la hipótesis "*Ulva compressa* presenta resistencia a arsénico y cadmio", se trabaja con una metodología experimental para observar en la realidad, y a escala, como la *Ulva compressa* reacciona ante estos metales pesados. En esta investigación, se logró comprobar la hipótesis que el alga es capaz de resistir a altos niveles de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{NaAsO}_4$ .

**Palabras claves:** *Ulva compressa*, alga, fitorremediación, capacidad antioxidante, metales pesados.

### Abstract

The contamination of water by heavy metals represents a global problem due to the toxic nature for the environment. Cadmium and arsenic are heavy metals that pollute water mainly from mining activity in the north of the country. Faced with this problem and with the intention of generating a method of phytoremediation is that the purpose of the research is to study whether the alga *Ulva compressa* is capable of resisting the heavy metal contamination of the north of the country and phytoremediate the waters. From the hypothesis "*Ulva compressa* presents resistance to arsenic and cadmium", we work with an experimental methodology to observe in reality and to scale as *Ulva compressa* reacts to these heavy metals. In this research, it was possible to test the hypothesis that the alga is able to withstand high levels of  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  and  $\text{NaAsO}_4$ .

**Keywords:** *Ulva compressa*, alga, phytoremediation, antioxidant capacity, heavy metals.



# Introducción

El agua es un recurso natural esencial para la vida en la biósfera, pues los organismos y ecosistemas existentes, necesitan de ella para su buen funcionamiento. Por ello, es fundamental mantenerla protegida de contaminantes que interfieran en la función que esta cumple.

A pesar de la descripción citada, hoy en día la condición del agua es crítica, ya que la mayor parte de los desechos generados por las actividades industriales y urbanas se liberan hacia cursos de agua, contaminándolas.

Al contrario de muchos contaminantes metálicos, los metales pesados generalmente no se eliminan de los ecosistemas acuáticos por procesos naturales, debido a que no son biodegradables, por lo cual permanecen de manera indefinida por cientos de años (Murray, 1996).

Un proyecto promedio de mega minería consume un caudal permanente, es decir, durante las 24 horas del día y durante todo el año, entre 600 y 1000 litros por segundo (IEETM, 2013).

El norte de Chile es una zona que constantemente se ve afectada por los residuos de la actividad minera, principalmente metales como el arsénico, plomo, cobre, manganeso, molibdeno, sulfatos, cadmio, níquel, cromo y otros elementos metálicos y no metálicos. Esta contaminación es un peligro latente para el ecosistema, afectando flora, fauna y seres humanos, la cual además afecta considerablemente el medio ambiente y a las costas de nuestro país (Tchernitchin, 2010).

Así es como surge la motivación de estudiar un organismo que presente una capacidad de resistencia a un

medio con alta presencia de contaminantes, y además que pueda colaborar con la descontaminación de aguas, como es el caso del alga verde *Ulva compressa*, la cual posee la capacidad de fitorremediación. Se ha investigado anteriormente con cobre ante 10  $\mu\text{M}$  de concentración del metal, en el cual se descubrió que utilizaba un mecanismo de resistencia en que actuaban las proteínas metalotioneína y fitoquelatina, activando de esa forma su actividad antioxidante (González *et al.*, 2010). Pero nunca con cadmio y arsénico que son altamente corrosivos para la salud de los seres vivos y el medio ambiente. Para esto se trabajó con una metodología experimental, la siguiente pregunta de investigación: ¿Es *Ulva compressa* capaz de presentar una resistencia alta ante los metales arsénico y cadmio?

## Objetivos

General: Conocer la tolerancia y capacidad antioxidante de *Ulva compressa* en un medio con presencia de arsénico y cadmio.

Específicos:

- 1) Evaluar la sobrevivencia de *Ulva compressa* en distintas concentraciones de arsénico y cadmio.
- 2) Determinar actividad antioxidante relacionada a la sobrevivencia ante concentraciones de arsénico y cadmio.

## Hipótesis

*Ulva compressa* presenta una alta resistencia ante los metales arsénico y cadmio.



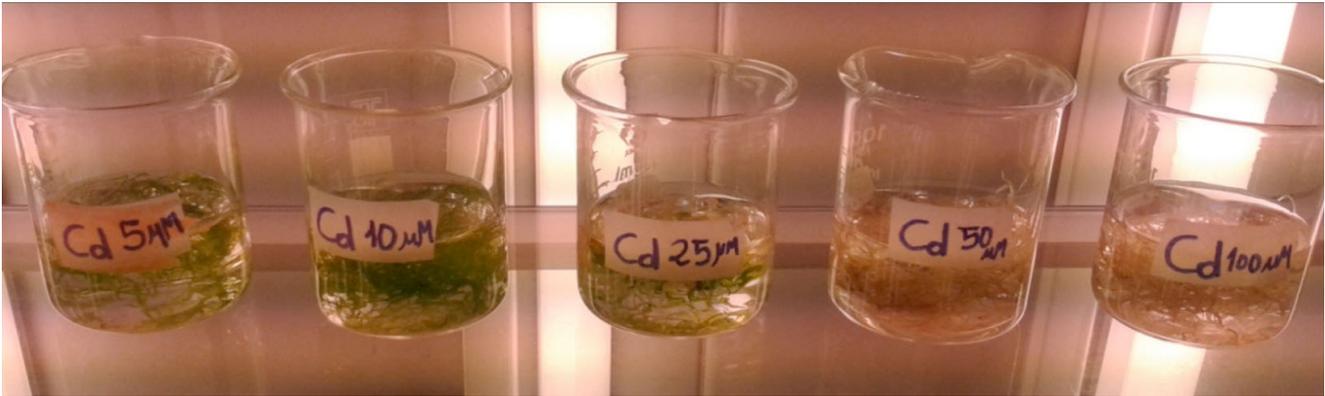


Imagen 1: Cultivo de *Ulva Compressa* con presencia de Cadmio (Séptimo día de cultivo).

## Metodología

### Materiales utilizados:

Micropipetas (P10, P20, P200 y P1000)

Vasos de precipitados

Placas de Petri

Tubos Falcón (15 y 50 mL)

Tubos Eppendorf (1,7 mL)

Cámaras de cultivo con fotoperiodo

Metales:  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{NaAsO}_4$

Nitrógeno líquido

Buffer fosfato de sodio

Alga *Ulva compressa*

Reactivo de Bradford

Espectrofotómetro

Centrifuga

Balanza

### Método:

Se comenzó con una recopilación de información bibliográfica, detallada y completa, para así llevar a cabo, con una mejor comprensión de términos, la metodología experimental.

## 1. Preparación de cultivos

Se prepararon cultivos consistentes en 0,75 g de alga en volumen de 50 mL de agua de mar, previamente filtrada, que contienen concentraciones de 0  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ ,

10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  o 0  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaAsO}_4$ .

Los cultivos se mantuvieron dentro de cámaras de cultivo, a 14° C con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, durante 7 días.

## 2. Extracción de proteínas de *Ulva compressa*

El alga obtenida de los cultivos con Cd y As, es seca con papel para quitar el exceso de agua, luego el tejido se pulverizó con nitrógeno líquido y se homogenizó con buffer fosfato de sodio 50 mM (pH 7,4, 20% glicerol, 2 mM beta-mercaptoetanol). Después se centrifugó la preparación 14000 rpm, durante 5 minutos y se rescató el sobrenadante. Se cuantificó la cantidad de proteínas de cada extracto, utilizando reactivo de Bradford y midiendo espectrofotométricamente a 595 nm.

## 3. Determinación de la capacidad antioxidante

Para determinar la capacidad enzimática antioxidante del alga expuesta a metales pesados, se procedió a medir la actividad guayacol peroxidasa. Se preparó una mezcla de reacción que contiene 15  $\mu\text{g}$  de proteína, 5  $\mu\text{L}$  del reactivo guayacol 0.3 mM, 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM y completando hasta 1 mL con buffer fosfato de sodio 50 mM. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se midió absorbancia a 470 nm por formación de tetrahidroguaieno.



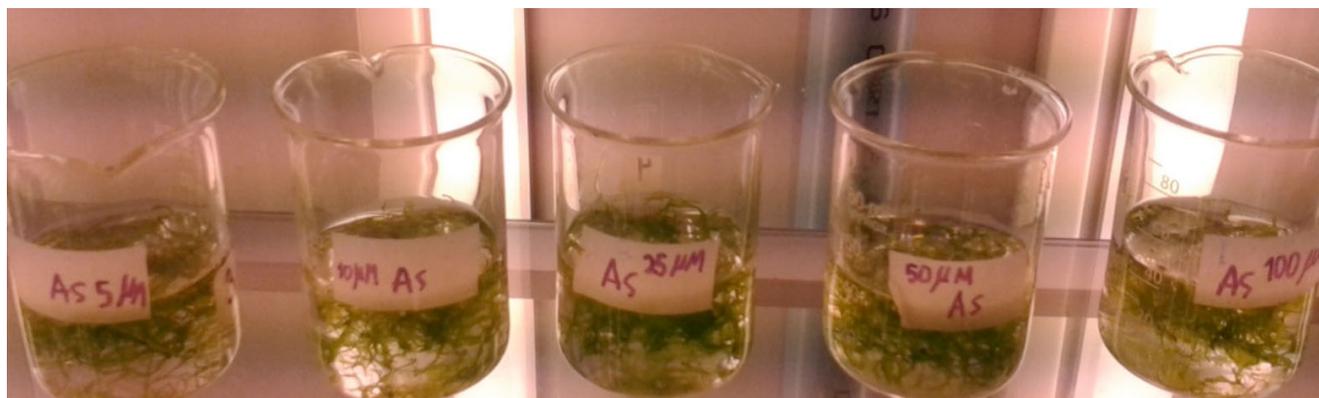


Imagen 2: Cultivo de *Ulva compressa* con presencia de arsénico (Séptimo día de cultivo)

## Resultados

Resultados de resistencia a diversas concentraciones de cadmio y arsénico.

### Cultivos con cadmio

El alga se mantiene saludable, con pigmentación y aspecto similares al día inicial. En cambio ante la concentración de 50 y 100  $\mu\text{M}$ , perdieron toda su pigmentación y el alga no sobrevive (Ver imagen 1).

### Cultivos con arsénico

El alga se mantuvo saludable hasta el séptimo día de cultivo y ninguna de las concentraciones produjo la muerte del alga (Ver imagen 2).

## Resultados capacidad antioxidante

Al exponer *Ulva compressa* a medios con arsénico y cadmio se obtuvieron los siguientes resultados expuestos en la Tabla (Ver Tabla N° 1).

\*GPX: Capacidad antioxidante total, de un conjunto de enzimas capaces de oxidar el sustrato guayacol que son parte de los mecanismos de defensa antioxidante, para evitar el daño producido por las especies reactivas de oxígeno durante eventos de estrés.

### Resultados GPX

La actividad antioxidante ante diferentes concentraciones de arsénico no varió tan drásticamente, lo que puede explicar su resistencia en todos los cultivos realizados. (Ver gráfico 1).

Tabla 1		
	Concentración del contaminante ( $\mu\text{M}$ )	Actividad Antioxidante ( $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mgproteína}$ )
Arsénico	0	2,3
	5	9
	10	10
	25	4,9
	50	5,1
	100	4,4
Cadmio	0	3,0
	5	24,1
	10	39,7
	25	3,3
	50	Alga no resiste
	10	Alga no resiste

En los cultivos en que el alga no resiste a concentraciones de cadmio o arsénico, no se mide la actividad antioxidante, ya que al estar en presencia de estos metales *Ulva compressa* no presenta ningún mecanismo de defensa, por lo que el alga muere.



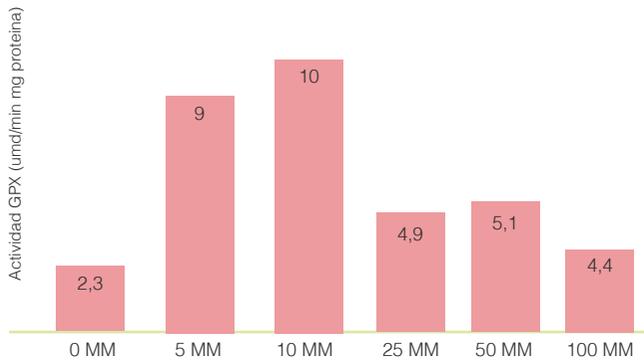


Gráfico 1: Actividad de Guayacol Peroxidasa en cultivo con arsénico.

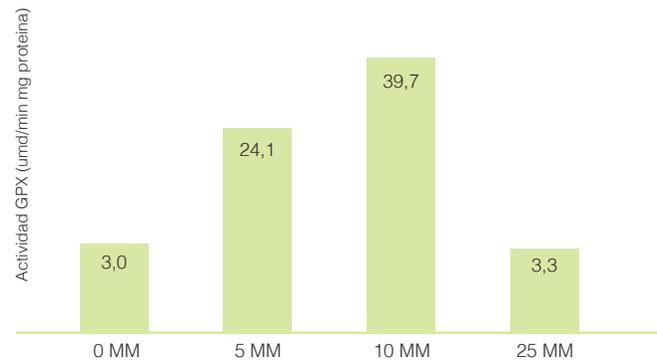


Gráfico 2: Actividad de Guayacol Peroxidasa en cultivo con cadmio.

La actividad antioxidante ante diferentes concentraciones de cadmio varió drásticamente solo en las concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{M}$ , lo que puede explicar su resistencia solo en algunos de los cultivos realizados (Ver gráfico 2).

## Discusión

Tras los datos obtenidos en la investigación realizada, queda claramente en evidencia que *Ulva compressa* tiene una potencial resistencia ante los metales cadmio y arsénico, ya que comparando las concentraciones a las que soportó ante cobre en la investigación señalada anteriormente (González *et al.*, 2010). En el caso de arsénico, el alga logró aumentar diez veces la concentración a la que resistía con cobre. Esto evidencia que puede ser una muy buena candidata para un posterior estudio con metales pesados, que tengan similar comportamiento a los que ya resiste.

Además, realizando una relación de esta resistencia con la actividad antioxidante; se concluye que a mayor concentración de metales el alga necesita mejorar su mecanismo de defensa ante este medio, por lo que es en estos casos en que utilizan las proteínas fitoquelatina y metalotioneína (González *et al.*, 2012); que son partes del mecanismo de defensa antioxidante, con el fin de captar los metales y sintetizarlos, para así sobrevivir en medios con presencia de cadmio y arsénico.

Es por esto que se atribuye una relación, entre la capacidad antioxidante y la capacidad de resistencia que tenga el alga, ya que para resistir debe activar el mecanismo de defensa, compuesto por estas proteínas que evitan una oxidación al capturar los cationes metálicos, para almacenarlos o expulsarlos de la célula.

Se puede observar además, que la actividad antioxidante del alga no fue plenamente en ascenso al aumentar la cantidad de concentración del metal, por lo que podría estar utilizando otro mecanismo de defensa no relacionado con las proteínas estudiadas, ya que sobrevive ante concentraciones muy altas, pero llega a un peak y su actividad antioxidante baja, en medios donde se pensaría que debería utilizar con mayor razón este mecanismo de defensa.

Además, a partir de los metales con los cuales se experimentó, se podría establecer una relación entre los metales ensayados en este trabajo y otros elementos químicos a los cuales *Ulva compressa* podría ser tolerante. Por ejemplo, el arsénico tiene propiedades químicas similares al azufre, fósforo, antimonio y estaño, por lo cual *Ulva* podría descontaminar aguas afectadas con estos contaminantes. Así como el cadmio, que posee propiedades parecidas a las del zinc, mercurio y cobre, metales pesados altamente tóxicos, tanto para el ambiente como para los seres humanos.



## Conclusión

Se logró responder la pregunta de investigación, ya que el alga verde *Ulva compressa* puede resistir a un ambiente contaminado por arsénico y cadmio, gracias a su capacidad antioxidante que le ayuda a sobrevivir en medios de hasta 100  $\mu\text{M}$  de As y 25  $\mu\text{M}$  de Cd.

También se puede concluir que el alga presenta una mayor capacidad antioxidante en los cultivos de arsénico de 5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  y una actividad moderada en los cultivos de 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ . Por otro lado, el alga presentó una gran capacidad antioxidante hasta 10  $\mu\text{M}$ , que disminuyó drásticamente en el cultivo de 25  $\mu\text{M}$ .

Queda como proyección, el estudio de *Ulva compressa* para una posible fitorremediación. Posterior a eso, comprobar si el alga efectivamente puede reducir la cantidad de contaminantes del medio y especies metálicas que puede internalizar.

También a largo plazo, se puede postular cultivos de *Ulva* en piscinas de cultivo en el norte y zonas habitadas de nuestro país, para así descontaminar aguas, siempre y cuando se le proporcionen una salinidad, temperatura y pH estables, con los cuales puedan realizar de forma más eficaz y fácil la limpieza del agua.

Y además, se propone estudiar si el cadmio interfiere con la biosíntesis de la clorofila, la cual necesita magnesio, que es un catión bivalente, lo que permitiría explicar la pérdida de pigmentación en los cultivos de altas concentraciones de metales.

## Agradecimientos

Grupo de investigación del Laboratorio de Biotecnología Marina de la Universidad de Santiago por el apoyo presentado para la realización de este trabajo.

## Bibliografía

Tchernitchin AN. 2010. Informe sobre los efectos en salud causados por metales pesados y otros compuestos provenientes del traslado de concentrados de cobre al puerto de Antofagasta. [www.diarioantofagasta.cl](http://www.diarioantofagasta.cl)

González A, Vera J, Castro J, Dennett G, Mellado M, Morales B, ... & Moenne A. 2010. Co-occurring increases of calcium and organellar reactive oxygen species determine differential activation of antioxidant and defense enzymes in *Ulva compressa* (Chlorophyta) exposed to copper excess. *Plant, cell & environment* 33: 1627 - 1640.

González A, Cabrera M, Henríquez MJ, Contreras RA, Morales B, Moenne A. 2012. Cross talk among calcium, hydrogen peroxide, and nitric oxide and activation of gene expression involving calmodulins and calcium-dependent protein kinases in *Ulva compressa* exposed to copper excess. *Plant Physiology* 158: 1451 - 1462.

IEETM. 2013. Minería sin agua y energía, imposible. Entrevista a Lucio Cuenca, del Observatorio latinoamericano de conflictos ambientales. [olca.cl/articulo/nota.php?id=103188](http://olca.cl/articulo/nota.php?id=103188).

Murray KS. 1996. Statistical comparisons of heavy-metal concentrations in river sediments. *Environmental Geology* 27:

