

Trabajo Original

Ecotoxicología

## **Evaluación de la toxicidad de un aceite de transformador contaminado con bifenilos policlorados utilizando como indicador la microalga de agua dulce *Scenedesmus dimorphus***

---

**Beatriz Angulo, José Vicente García**

PDVSA-INTEVEP, Los Teques, Estado Miranda, Venezuela

Gerencia de Ambiente e Higiene Ocupacional

---

## Resumen

Se evaluó la toxicidad de un aceite contaminado con bifenilos policlorados contemplando dos escenarios distintos: alta y baja dispersión. Para esto se empleó como indicador la microalga de agua dulce *Scenedesmus dimorphus*. Los resultados indican que el aceite contaminado posee una toxicidad 192 veces mayor cuando se promueve su dispersión. Las pruebas de laboratorio indican que los procedimientos de dispersión química no parecen ser recomendables en eventos de derrames.

## Abstract

Toxicity of PCB´s contaminated oils to freshwater algae *Scenedesmus dimorphus* was analyzed considering two situations: high and low dispersion. The results indicates that contaminated oils are 192 times more toxic when they are dispersed. Therefore, for events where PCB´s contaminated oils are spilled, chemical dispersion procedures are not recommended.

## Introducción

Los bifenilos policlorados (BPC) forman parte de la lista de contaminantes orgánicos persistentes del Convenio de Estocolmo [1], además de ser considerados contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA-USA) debido a su alta toxicidad, gran persistencia en el ambiente y baja degradabilidad [2].

Dichos organoclorados fueron sintetizados por primera vez en 1881 y producidos a escala industrial entre 1929 y 1993. Debido a su gran estabilidad, fueron usados como biocidas en aceites lubricantes, fluidos hidráulicos, agentes de transferencia de calor y de aislamiento, aditivos en plásticos, adhesivos, retardadores de fuego, pesticidas, cobertores de cables eléctricos, aditivos de pinturas y en papel sustituto del papel carbón. En Venezuela, una de sus mayores aplicaciones fue la de aislante eléctrico de transformadores, muchas veces mezclado con aceites dieléctricos.

Los productos comerciales de BPC recibieron distintos nombres tales como Aroclor, Clophen, y Santotherm y estaban constituidos por mezclas de hasta 50 congéneres. Se estima que durante este periodo se generaron 1,5 millones de toneladas [3].

A partir de la década de los setenta se comprobó su alta toxicidad y persistencia en el medio ambiente, lo que generó un decaimiento en su producción así como la organización de campañas de evaluación de BPC en distintas matrices ambientales tales como agua, suelo, biota y partículas suspendidas en aire, entre otros.

Estudios previos han comprobado su elevada dispersión en el medio ambiente asociados a la materia suspendida que viaja a través de los cuerpos de agua, lluvias y otras fuerzas físicas, además de su bioconcentración y magnificación en distintos niveles de la cadena trófica [4].

A pesar de que actualmente se detuvo la producción de BPC, a nivel mundial aún se mantienen equipos en uso, inventarios de pasivos y ecosistemas impactados. Venezuela no escapa de esta realidad y por eso se hace necesario investigar sobre cómo mejorar la gestión de estos desechos en caso de un eventual derrame.

El interés de la comunidad científica en la evaluación ecotoxicológica de dichos organoclorados sigue vigente [5, 6]. Se han realizado muchos estudios sobre la toxicidad de los BPC en sus formas comerciales puras, pero muy pocas evaluaciones han incluido al aceite dieléctrico contaminado.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la toxicidad en agua dulce de un aceite de transformador contaminado con BPC en dos escenarios distintos: alta y baja dispersión química, mediante el método OECD 201 utilizando la microalga *Scenedesmus dimorphus*. [7]

## **Materiales y Métodos**

Se empleó como bioindicador una cepa de *Scenedesmus dimorphus*, aislada en Barquisimeto, estado Lara [8], cultivada en el laboratorio en medio EPA (EPA, 2002) [9].

La sensibilidad del bioindicador se evaluó mediante una referencia de dicromato de potasio con 99% de pureza, marca J. T. Baker y un patrón comercial de 2000 mg/L de Aroclor 1242 en metanol suministrado por ChemService.

Para los ensayos de toxicidad se empleó una mezcla de aceite de transformador, compuesta por 50% de aceite dieléctrico y 50% de una mezcla de los arocloros 1242, 1248, 1254 y 1260 y clorobencenos. El aceite contaminado se evaluó de dos formas: alta y baja dispersión para simular dos posibles escenarios en el ambiente. La dispersión del aceite se realizó empleando n-hexano.

Para determinar la toxicidad se empleó el método OECD 201 que consiste en la evaluación de la inhibición del crecimiento de cultivos de algas expuestos a distintas concentraciones de la mezcla de bifenilos policlorados en aceite de transformador con respecto a cultivos control sin exposición a los BPC.

#### 2.1. Análisis químico:

Se realizó la caracterización química del aceite dieléctrico contaminado con los BPC y de los medios de exposición de alta y baja dispersión. Para todas las muestras se realizó un proceso de purificación empleando como fase estacionaria florisil, mediante el procedimiento descrito en el método EPA 3620C [10]. Para los medios de exposición, se realizó la separación física de las fases y la posterior extracción de los compuestos orgánicos siguiendo el procedimiento 3510C EPA [11]. El análisis químico se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas según el método 8270 EPA para determinación de semivolátiles [12].

#### 2.2. Preparación de las soluciones de exposición para los ensayos de referencia con cromo (VI):

A partir de una solución nominal de 1000 mg/l de cromo (VI) preparada a partir de  $K_2Cr_2O_7$  y agua destilada. Se prepararon cinco concentraciones distintas en medio de cultivo.

2.3. Preparación de los medios de exposición para los ensayos de referencia con aroclor 1242:

Se prepararon cinco distintas concentraciones en el medio de cultivo colocando el volumen necesario del patrón de aroclor sobre cada fiola y permitiendo la evaporación total del metanol previo a la colocación del medio de cultivo. Cada uno de los medios de exposición se sometió a 80 r.p.m. de agitación durante 4 horas a 25°C.

2.4. Preparación de los medios de exposición para los ensayos de baja y alta dispersión:

Para los medios de baja dispersión se diluyó el aceite contaminado en aceite no contaminado, empleando este último como diluyente; a partir de esta solución se prepararon cinco distintas concentraciones según el siguiente procedimiento: se colocó un volumen dado de la mezcla de aceite y arocloros en cada fiola permitiendo la evaporación total de los clorobenzenos previo a la colocación del medio de cultivo. Cada uno de los medios de exposición se sometió a 80 r.p.m. de agitación durante 24 horas con una temperatura promedio de 28°C. Para la preparación de la mezcla de alta dispersión se empleó n-hexano como diluyente. El resto del procedimiento fue similar al descrito para la mezcla de baja dispersión. Se prepararon controles de sólo medio de cultivo, medio de cultivo y aceite dieléctrico y medio de cultivo y hexano.

2.5. Ensayos de exposición:

Para los ensayos de exposición se sembró 1 ml de medio con una densidad de *Scenedesmus dimorphus* de  $10^4$  cel/ml en cada uno de los medios de exposición y controles. Las condiciones para los ensayos de exposición se muestran en la Tabla 1.

## **Resultados y Discusión**

3.1. Ensayos de referencia:

Tal como se muestra en las tablas 2 y 3 respectivamente, los ensayos de referencia indican que la especie *Scenedesmus dimorphus* posee muy buena sensibilidad frente a un tóxico inorgánico como el cromo hexavalente y al patrón comercial de BPC Aroclor 1242.

### 3.2. Ensayos de exposición

En la Tabla 4 se observa que en la evaluación del aceite de transformador contaminado con BPC, la toxicidad aumenta 192 veces al ser dispersado por un solvente orgánico como hexano. Los controles con y sin solvente (hexano o metanol) muestran incrementos en las densidades celulares de acuerdo a la norma OECD. No se evidencian efectos por adición del solvente en las tasas de crecimiento instantáneas ( $\mu$ ) (Tabla 5). En la figura 1 se muestran los cromatogramas relativos a 10 mg/l de los aceites contaminados con bifenilos policlorados previo a su interacción con el medio acuoso. En la misma se observan 2 clorobencenos, que por ser volátiles se eliminan durante la preparación de las fracciones acuosas. En la figura 2 se observan los cromatogramas correspondientes a los ensayos de baja y alta dispersión. En ambas muestras se aprecian los mismos bifenilos policlorados. Sin embargo, se puede ver que para el ensayo de alta dispersión la abundancia de los bifenilos es mucho mayor que para el ensayo de baja dispersión. Esto demuestra que el uso de solventes durante la preparación de los medios de exposición promueve la migración de los BPC hacia la fracción acuosa probablemente en forma de suspensión.

### Conclusiones

1. La microalga de agua dulce *Scenedesmus dimorphus* se cultivó fácilmente en condiciones de laboratorio empleando el medio EPA.
2. *Scenedesmus dimorphus* presentó una excelente sensibilidad al Cr (VI), lo que indica que puede ser utilizado como indicador de toxicidad en ambientes de agua dulce.
3. *Scenedesmus dimorphus* presentó una sensibilidad para el Aroclor 1242 similar a la reportada en la bibliografía empleando otras especies de algas.
4. El aceite contaminado con BPC posee una toxicidad 192 veces mayor cuando es dispersado por el hexano. Esto indica que frente a un derrame accidental de este producto no debe utilizarse ningún agente dispersante.

**Tabla 1 Condiciones para la ejecución de los ensayos de exposición de microalgas *Scenedesmus dimorphus* al aceite de transformador contaminado con BPC y controles**

| Parámetro                        | Condición                                   |
|----------------------------------|---|
| Temperatura                      | (25 +/- 2) °C                               |
| Tipo de luz                      | Fluorescente                                |
| Fotoperiodo e intensidad         | Luz continua, 8000 lux                      |
| Envases de prueba                | Fiolas de 125 ml                            |
| Volumen de exposición            | 100 ml                                      |
| N° de réplicas por concentración | 3   |
| Agua de dilución                 | Medio de cultivo                            |
| Duración del bioensayo           | 72 horas                                    |
| Tipo de ensayo                   | Estático sin renovación                     |
| Efecto medido                    | Crecimiento poblacional (EC <sub>50</sub> ) |

**Tabla 2 Sensibilidad de algunas microalgas de agua dulce al cromo (VI)**

|                                  | EC <sub>50</sub> (mg/l) | Intervalo (p<0,05) | Referencia                  |
|----------------------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------------|
| <b>Scenedesmus dimorphus</b>     | 0,33                    | (0,33-0,34)        | Este estudio                |
| <b>Scenedesmus subspicatus</b>   | 0,53                    | (0,2-0,8)          | ISO, 2004 [13]              |
| <i>Selenastrum capricornutum</i> | 0,84                    | (0,6-1,0)          | ISO, 2004 [13]              |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i>     | 1,6*                    | -                  | Höresic & Balogh, 2002 [14] |

\* Concentración efecto 50 a las 96 h

**Tabla 3 Sensibilidad de algunas microalgas de agua dulce al Aroclor 1242**

|                                  | Efecto                     | (µg/l) | Intervalo (p<0,05) | Referencia                   |
|----------------------------------|----------------------------|--------|--------------------|------------------------------|
| <b>Scenedesmus dimorphus</b>     | EC <sub>50</sub>           | 97,5*  | (88,7-100)         | Este estudio                 |
| <i>Selenastrum capricornutum</i> | EC <sub>50</sub>           | 43,8   | -                  | Mayer et al., 1998 [15].     |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i>     | Inhibición del crecimiento | 100    | -                  | Hawes et al., 1976 [16].     |
| <i>Euglena gracilis</i>          | Inhibición del crecimiento | 1000   | -                  | Bryan & Olafsson, 1978 [17]. |

**Tabla 4. Sensibilidad del *Scenedesmus dimorphus* a la mezcla de aceite de transformador contaminado con BPC y arocloros según su dispersión**

|   | EC <sub>50</sub> * (µg/l)<br>72 h<br>Intervalo<br>(p<0,05) | NOEC**<br>(µg/l) | LOEC***<br>(µg/l) | VC****<br>(µg/l) | Clasificación<br>GESAMP 2002 [18] |
|---|--|------------------|-------------------|------------------|-----------------------------------|
| Aceite de transformador contaminado poco disperso | 19.200   | 10.000           | 100.000           | 31,6             | Moderadamente tóxico              |
| Aceite de transformador contaminado disperso      | 102  | 50               | 100               | 70,7             | Altamente tóxico                  |
| Aroclor 1242                                      | 97,5   | 50               | 100               | 70,7             | Altamente tóxico                  |

\* Concentración efecto 50 a las 72 h método Spearman-Kärber

\*\* Concentración de efectos no observados

\*\*\* Concentración menor de efectos observados

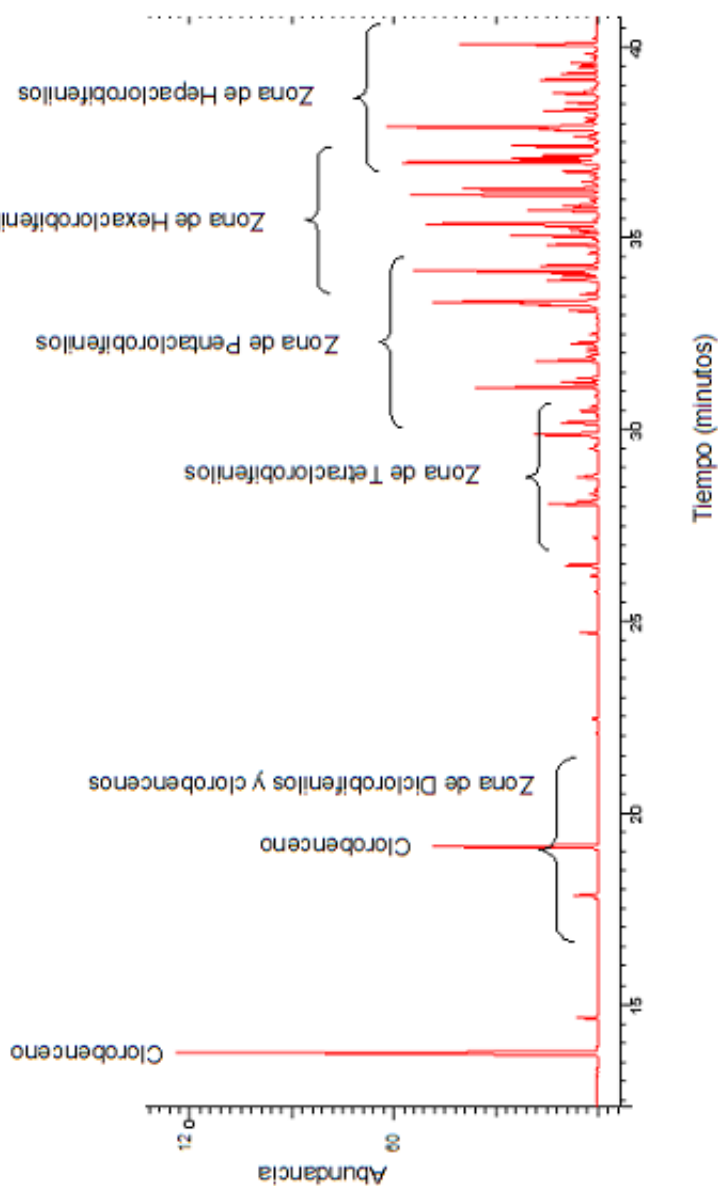
\*\*\*\* Valor crítico o concentración máxima permisible

**Tabla 5. Tasas de crecimiento instantáneas obtenidas en los controles de los ensayos para la evaluación de la toxicidad de las mezclas de aceite dieléctrico no contaminado, arocloros y cromo hexavalente**

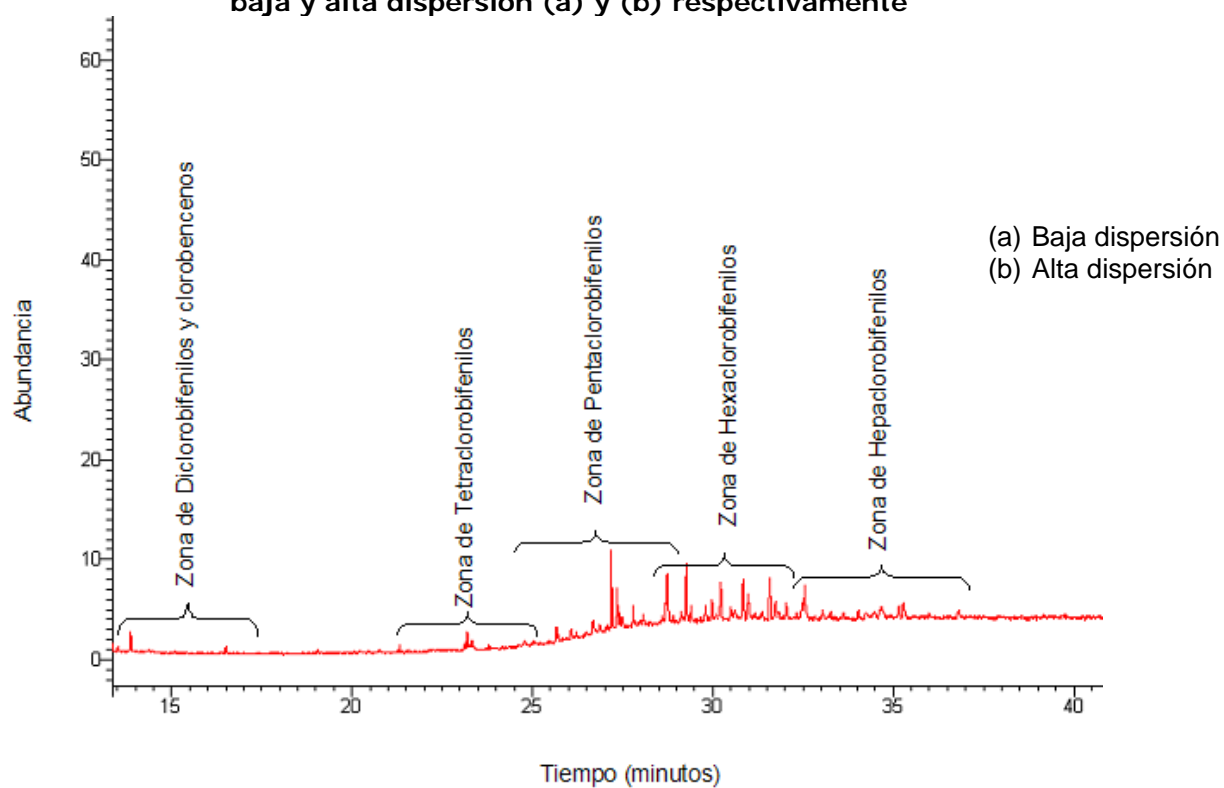
|                                       | Factor de incremento de densidad celular en 72 h | µ<br>(cél/ml/h)<br>$\ln(\text{densidad final} - \text{densidad inicial})$<br>72 h |
|---------------------------------------|--|---|
| Norma OECD 201                        | > 16   | -   |
| Aroclor 1242                          |  |   |
| Control sin metanol                   | 22,10  | 0,0400  |
| Control con metanol                   | 36,14  | 0,0498  |
| Aceite dieléctrico puro poco disperso |  |   |
| Control sin aceite                    | 79,37  | 0,0608  |
| Control con aceite                    | 64,55  | 0,0579  |
| Aceite dieléctrico puro disperso      |  |   |
| Control sin hexano                    | 58,51  | 0,0567  |
| Control con hexano                    | 55,43  | 0,0557  |
| Cromo hexavalente                     |  |   |
| Control                               | 52,38  | 0,0550  |



**Fig. 1** Cromatograma para los bifenilos policlorados extraídos de la matriz de aceite contaminado con BPC's.



**Fig. 2 Cromatograma de la fracción acuosa para los bifenilos policlorados en baja y alta dispersión (a) y (b) respectivamente**



---

## Referencias

1. Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes. Disponible en:  
[http://www.pops.int/documents/convtext/convtext\\_sp.pdf](http://www.pops.int/documents/convtext/convtext_sp.pdf).
2. Contaminantes prioritarios según EPA. Apéndice A del CFR. Parte 423. Disponible en:  
<http://www.epa.gov/waterscience/methods/pollutantas.htm>
3. BREIVIK K., SWEETMAN A., PACYNA J., JONES K., Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners — A mass balance approach. *Science of the Total Environment*. 377-2-3, p. 296-307. 2007.
4. OLIVER B., NIIMI A. Trophodynamic analysis of polychlorinated biphenyl congeners and other chlorinated hydrocarbons in the lake Ontario ecosystem. *Environmental Science and Technology*. 22. p.388-397. 1988.
5. STEMBERG M., ANDERSON P. Selection of non-dioxin-like PCBs for in vitro testing on the basis of environmental abundance and molecular structure. *Chemosphere*. 71. p. 1909-1915. 2008.
6. MACKEN A., GILTRAP M., FOLEY B., Mc GOVERN E., MC HUGH B., DAVOREN M. A model compound study: the ecotoxicological evaluation of five organic contaminants employing a battery of marine bioassays. *Environmental Pollution*. 153-3. p. 627-637. 2008
7. OECD Guideline for testing of chemicals. Alga, grow inhibition test. 1984. Disponible en:  
[http://www.oecd.org/document/23/0,2340,en\\_2649\\_34379\\_1948503\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/23/0,2340,en_2649_34379_1948503_1_1_1_1,00.html)
8. YACUBSON, S. Algas de Ambientes Acuáticos continentales, nuevas para Venezuela. Universidad del Zulia. 1969.
9. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 4ta Edición. (EPA-821-R-02-013), Washington DC. 2002.
10. Method 3620C. Florisil cleanup. Environmental Protection Agency. CD-ROM. Revisión 3. 2007.

11. Method 3510C. Separatory funnel liquid-liquid extraction. Environmental Protection Agency. CD-ROM. Revisión 3. 1996.
12. Method 8270D. Semivolatíole organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Revisión 4. 2007.
13. ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL PARA LA ESTANDARIZACIÓN (ISO). Norma No. ISO 8692. Second edition, OCT.2004. Water quality – freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. ISO 8692:2004(E).
14. HÖRCSIK, Z., BALOGH Á. Intracellular distribution of chromium and toxicity on growth in *Chlorella pyrenoidosa*. Acta Biologica Szegediensis. 46 (3-4) p. 57-58, 2002.
15. MAYER P., RUSSELL C., NYHLOM N. A simple *in vitro* fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. Water Research. 31 (10) p. 2525-2531.1997.
16. HAWES M., KRICHER, J., UREY, J. The effects of various aroclor fractions on the population growth of *Chlorella pyrenoidosa*. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology. 15 (14-8). 1976.
17. BRYAN A., OLAFSSON P. The effect of polychlorobiphenyls (aroclor 1242) on bicarbonate- C-14 uptake by *Euglena gracilis*. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology. 19 (3). 1978.
18. GRUPO DE EXPERTOS EN LOS ASPECTOS CIENTÍFICOS DE LA PROTECCIÓN DE AMBIENTES MARINOS (GESAMP) (ed). The revised GESAMP Hazard evaluation procedure for chemical substances carried by ships. REPORTE no. 64. p. 39. Londres, (2002).

**Recibido: 07/05/09**

**Aceptado: 15/05/09**