



**UNIVERSIDAD DE A CORUÑA**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología Celular y Molecular**

**Área de Microbiología**

**Toxicidad ejercida por el herbicida atrazina sobre  
la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas  
reinhardtii* Dangeard**

**Ánxela Fernández Naveira**

**A Coruña, 2014**



El presente Trabajo Fin de Máster ha sido realizado en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña, bajo la dirección de la Dra. Concepción Herrero López, Catedrática de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña.

A Coruña, 18 de julio de 2014



Agradecimientos:

En primer lugar querría darle mi más sincero agradecimiento a Concepción Herrero, mi tutora en este trabajo, ya que si ella no me hubiese otorgado la posibilidad de colaborar en este proyecto, no estaría hoy escribiendo esto.

Por otro lado, gracias a todos los profesores del Laboratorio de Microbiología: Enrique Torres por sus clases de estadística y su interés en ayudarme; a Ángeles Cid y Carmen Rioboo, por estar ahí para resolver mis dudas los primeros días de caos.

A mis compañeras de laboratorio: Marta Seoane, Marta Esperanza, Roi y a mi compañera y amiga Iria López por toda la ayuda que me prestaron durante este proyecto.

Gracias a mi familia, sobre todo a mis padres, mis abuelos y a Pancho por su continuo interés, apoyo, compañía y esfuerzo.

Y por último gracias a mis amigas las que están aquí conmigo y las que están lejos y a Dani por su continua compañía, interés, ánimos en los momentos en los que todo sale mal y momentos de desconexión.



## Índice:

<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Objetivo</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	<b>6</b>
3.1. Descripción de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Dangeard .....	6
3.2. Cultivo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	8
3.3. Preparación de la solución stock de atrazina .....	9
3.4. Determinación de la densidad celular .....	10
3.5. Determinación espectrofotométrica de pigmentos fotosintéticos .....	10
3.6. Determinación de proteínas hidrosolubles .....	11
3.7. Análisis elemental .....	12
3.8. Determinación espectrofotométrica de la actividad nitrato reductasa .....	13
3.9. Análisis estadístico .....	14
3.10. Diseño experimental .....	15
<b>4. Resultados y discusión</b> .....	<b>16</b>
4.1. Crecimiento de <i>C. reinhardtii</i> .....	16
4.2. Pigmentos fotosintéticos de <i>C. reinhardtii</i> .....	20
4.3. Proteínas de <i>C. reinhardtii</i> .....	26
4.4. Composición elemental de <i>C. reinhardtii</i> .....	28
4.5. Actividad nitrato reductasa de <i>C. reinhardtii</i> .....	29
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>31</b>
<b>6. Bibliografía</b> .....	<b>32</b>



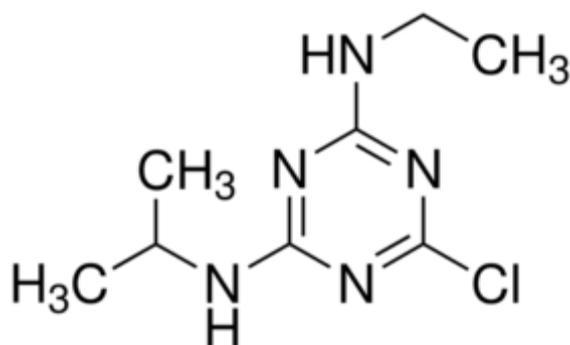
## 1. INTRODUCCIÓN

La actividad antropogénica constituye una constante amenaza para la estabilidad de los ecosistemas acuáticos, receptores de multitud de agentes químicos que pueden tener un efecto directo sobre la biota que los habita.

La agricultura es, al igual que muchas actividades humanas, una práctica con un rápido crecimiento en respuesta a la creciente población humana y a un mundo cada día más exigente. Durante las últimas décadas, ha habido un aumento dramático en el uso de herbicidas y otros productos químicos en respuesta a este rápido crecimiento. Como consecuencia, estos herbicidas pueden entrar en los ecosistemas acuáticos por diversas vías, principalmente mediante los efluentes agrícolas, convirtiéndose de este modo en los contaminantes orgánicos más frecuentes en estos ambientes (Cerejeira *et al.*, 2003).

Estos herbicidas, cuyo objetivo es su acción en el medio agrícola, no pierden su actividad en el nuevo medio en el que se incorporan y pueden afectar a otros organismos provocando cambios en su estructura y actividad, pudiendo afectar incluso a los seres humanos.

Uno de estos herbicidas usados en la agricultura es la atrazina, 6-cloro-N-etil-N'-(1-metiletil)-triazina-2,4-diamina. La atrazina es un herbicida tipo triazina; esta familia de herbicidas se caracteriza por presentar en su estructura un anillo heterocíclico, análogo al anillo bencénico, pero con tres átomos de carbono sustituidos por átomos de nitrógeno. En función de la posición de sus átomos de carbono se distinguen tres isómeros de triazina: 1,2,3-triazina, 1,2,4-triazina y 1,3,5-triazina. En este trabajo se ha utilizado la atrazina (1,3,5-triazina).



**Figura 1.** Estructura química de la atrazina

La atrazina se caracteriza por ser sistémica, residual y selectiva para el control de numerosas malezas de hoja ancha y gramíneas anuales en cultivos de caña de azúcar, maíz y sorgo.

Su mecanismo de acción es la inhibición de la fotosíntesis, interfiriendo en el transporte de electrones en el fotosistema II (Moreland, 1980; van der Heever y Grobbelaar, 1998; Bi Fai *et al.*, 2007; Chalifour *et al.*, 2009). El sitio de unión de la atrazina está localizado en la proteína D1 del PS II; esta unión provoca el bloqueo de la cadena de electrones de la quinona A (QA) a la quinona B (QB), el aceptor primario y secundario de electrones respectivamente (Diner y Petrouleas, 1987). En general, se produce la competencia con la plastoquinona por el sitio de unión (Q<sub>B</sub>) de la proteína D1 en el centro de reacción del PS II, lo que provoca la interrupción de la transferencia de electrones y, por lo tanto, la síntesis de ATP y NADPH (Oettmeier *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 2003).

Cuando se aplica al suelo, la atrazina es absorbida por el sistema radical y rápidamente transportada hacia las hojas, vía apoplástica. Si se aplica directamente al follaje, se comporta como un herbicida de contacto, al no poder movilizarse vía simplasto (floema). Puede ser degradada por plantas superiores, existiendo diferencias entre ellas en cuanto a la tasa y velocidad de metabolización, y puede ser a través de algunos procesos como la desalquilación, conjugación o absorción.

La persistencia de este herbicida en el medio ambiente depende de las características del propio medio en el que se encuentre. Si está en el suelo será de unos días o meses pero nunca o casi nunca años, ya que este herbicida es degradado a lo largo de una temporada de cultivo.

Además, este herbicida puede ser volatilizado a la atmósfera (Starr y Golfelty, 1990; Gish *et al.*, 1994) y posteriormente devuelto a la tierra con las lluvias. Como consecuencia puede llegar al agua de los ríos, aguas subterráneas, lagos, etc, donde será relativamente más persistente (Solomon *et al.*, 1996) ya que su degradación en este tipo de ambientes es mucho más lenta. De hecho, es común encontrar restos de este herbicida en muestras de agua que se encuentran cerca de zonas agrícolas (Herman *et al.*, 1986; Meakins *et al.*, 1995; Southwick *et al.*, 1995; Gaynor *et al.*, 1998).

La atrazina no tiende a acumularse en organismos vivos como algas, bacterias, moluscos o peces, y, por tanto, no se acumula en la cadena alimentaria. No obstante, sí se han encontrado evidencias de absorción por las raíces de las plantas y algunos animales del suelo, como las lombrices de tierra (Celis *et al.*, 1997).

Para el estudio de los efectos de estos contaminantes en el medio ambiente se suelen utilizar las microalgas debido a que son consideradas como indicadores útiles de la contaminación ambiental (Campanella *et al.*, 2001).

Las microalgas son un grupo muy diverso de organismos fototrofos ubicuos en la mayoría de los ambientes, especialmente en los acuáticos, donde estos organismos destacan por su importante papel en la cadena trófica, ya que son los principales productores primarios, además de potenciales organismos indicadores de la calidad del agua (Blaise, 1993). Por lo tanto, cualquier agente químico que altere la comunidad fitoplanctónica y/o su producción primaria, tendrá como consecuencia desequilibrios en niveles tróficos superiores, generando graves consecuencias en los ecosistemas (Franklin *et al.*, 2000).

Todo esto, además de su facilidad a la hora de manipular, cultivar en el laboratorio y su sensibilidad ante un amplio grupo de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, hacen que las microalgas se empleen como indicadores biológicos en estudios para la evaluación de la toxicidad de diferentes contaminantes frecuentes en ecosistemas dulceacuícolas (como los herbicidas) y cada vez están cobrando más relevancia (Wehr, 2011). De hecho, los bioensayos basados en la inhibición del crecimiento de las microalgas *Selenastrum capricornutum* (actualmente denominada *Pseudokirchneriella pseudocapitata*) y *Scenedesmus subspicatus* están incluidos dentro de los bioensayos de toxicidad obligados para el registro y notificación de nuevos productos químicos, tanto en la Unión Europea como en los Estados Unidos (ISO 8692, 2012).

A pesar de todo esto, las microalgas están poco representadas como organismos de ensayo en los métodos estandarizados. Además, se suelen elegir especies en función de su facilidad de cultivo o su grado de representación ecológica, más que por ser buenas indicadoras de la presencia de contaminantes. Por tanto, se debe tener en cuenta la necesidad de introducir nuevas y más sensibles especies microalgales que puedan ser utilizadas en bioensayos de toxicidad, de tal forma que se facilite la elección del método más adecuado, atendiendo a la naturaleza del medio acuático que se pretende proteger y

los organismos que habitan naturalmente en dicho medio, para que los ensayos sean cada vez más eficientes y representativos.

En el Laboratorio de Microbiología de la facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña, donde se ha realizado este trabajo, se han utilizado microalgas para el análisis de distintos contaminantes en el medio acuático, como antibióticos, metales o herbicidas (Cid *et al.*, 1995; Rioboo *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2009).

En el presente trabajo, se ha seleccionado la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard como organismo de ensayo de la toxicidad del herbicida atrazina. Esta microalga es considerada como sistema modelo para el análisis genético y caracterización bioquímica entre los organismos eucariotas (Collard y Matagne, 1990), además de las ventajas que supone su cultivo en laboratorio (Harris, 1998), fácil manipulación, bajos requerimientos nutritivos, rápido crecimiento, ser haploide y posibilidad de inducir la reproducción sexual.

## **2. OBJETIVO**

El objetivo general de este trabajo es el estudio de la toxicidad ejercida por el herbicida atrazina sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii*.

Este objetivo se concreta en el análisis del efecto de distintas concentraciones de atrazina a lo largo del tiempo sobre distintos parámetros como crecimiento microalgal, composición bioquímica relativa al contenido en pigmentos fotosintéticos, proteínas hidrosolubles y composición elemental, y actividad enzimática, concretamente actividad nitrato reductasa.

El análisis de todos estos parámetros permitirá una aproximación a su aplicación en estudios ecotoxicológicos con esta microalga.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Descripción de *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard

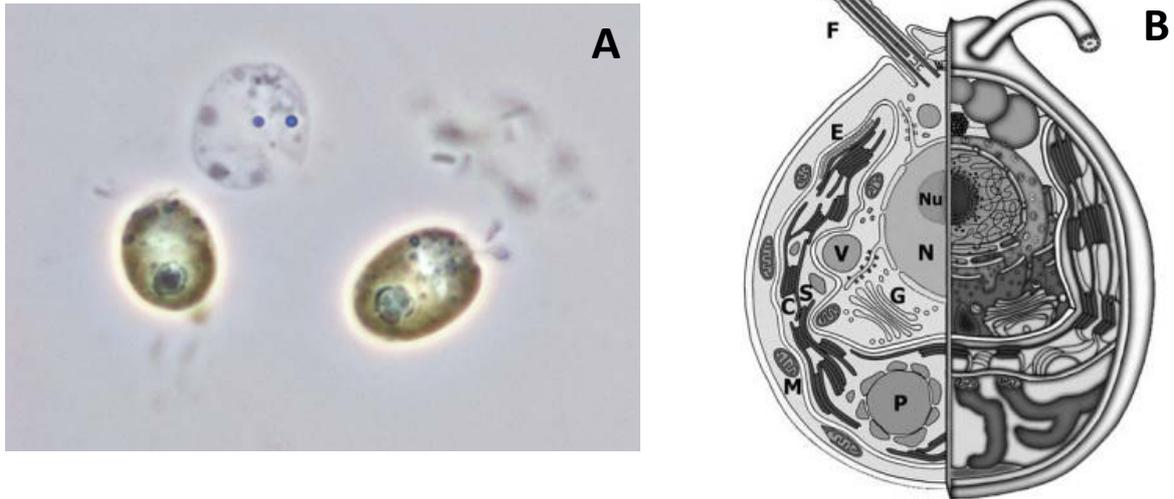
La especie microalgal utilizada ha sido *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard, cepa CCAP 11/32A mt+, procedente de la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos del Laboratorio Marino de Dunstaffnage (Escocia, Reino Unido).

Según la clasificación de Bold (Bold y Wynne, 1985) el género *Chlamydomonas* se incluye en la división *Chlorophyta*, clase *Chlorophyceae*, orden *Volvocales*, familia *Chlamydomonadaceae*. Sin embargo, existe una serie de estudios filogenéticos en los que se ha visto que ciertas especies pertenecientes al género *Chlamydomonas* se encuentran más relacionadas con algas coloniales del orden *Volvocales* que con otras especies unicelulares que están reunidas dentro de la familia *Chlamydomonadaceae* (Harris, 2009).

Las células de *Chlamydomonas* tienen un tamaño comprendido entre 9 y 12  $\mu\text{m}$  de longitud y de 4 a 8  $\mu\text{m}$  de diámetro; en cuanto a su forma, pueden ser de distintas morfologías según la especie: ovoide, elipsoidal o esférica; en el caso de *C. reinhardtii* posee forma ovoide. A pesar de las diferencias en función de la especie, poseen un plan corporal básico, el cual consiste en una estructura polar, con dos flagelos apicales, que se encuentran localizados en el polo anterior de la célula, donde es bastante común encontrar vacuolas contráctiles. La mayoría de especies de este género poseen un cloroplasto parietal con forma de copa que se encuentra en la parte basal y asociado a este podemos encontrar uno o más pirenoides. En esta zona basal también podemos observar una mancha ocular de coloración rojiza.

El cloroplasto suele estar rodeando parcialmente al núcleo, que se localiza en el centro de la célula acompañado de un nucléolo bastante prominente. Además del cloroplasto, también se encuentra rodeando al núcleo el aparato de Golgi que a su vez suele estar rodeado por un sáculo del retículo endoplasmático.

En la mayoría de las especies de *Chlamydomonas* las mitocondrias se encuentran localizadas en la región central entre el cloroplasto y el plasmalema.



**Figura 2.** (A) Fotografía de *Chlamydomonas reinhardtii* (B) Estructura interna de *C. reinhardtii* (Nickelsen y Kück, 2000); núcleo (N), nucléolo (Nu), flagelo (F), cloroplasto (C), mancha ocular (E), pirenoide (P), mitocondria (M), vesículas de Golgi (G), granos de almidón (S), vacuolas (V).

Las células se encuentran rodeadas de pared celular, pero no en su totalidad, ya que la zona apical donde emergen los flagelos carece de esta. Esta pared celular es singular en comparación con la de otras microalgas por el hecho de que se encuentra compuesta sólo por glicoproteínas fibrosas, careciendo de polisacáridos. Se pueden diferenciar tres capas distintas en la pared: una capa granular central, entre dos matrices cristalinas altamente ordenadas en subunidades glicoproteicas. Es común encontrar una capa mucilaginosa en algunas especies de este género.

*Chlamydomonas reinhardtii* puede reproducirse tanto asexual como sexualmente. En este trabajo se han utilizado células *mating* +, para garantizar de este modo que solo se reproduzcan asexualmente. En condiciones de deshidratación, las células pueden pasar a un estado palmeloide (Erbes *et al.*, 1997) formando agrupaciones de células rodeadas de mucílago común.

En condiciones de laboratorio, las células de *C. reinhardtii* pueden llevar a cabo dos mitosis de forma secuencial dentro de una sola pared de la célula madre, dando lugar a cuatro células hijas. Además, en esta especie se ha descrito que estas cuatro células hijas pueden realizar una tercera división para dar lugar a una progenie de 8 células (Johnson y Porter, 1968), resultando, por tanto, de una única etapa de crecimiento 4 ó 8 células hijas por cada célula madre.

Este género es muy amplio y abarca a una gran cantidad de especies así como una gran distribución (Bischoff, 1959) (aguas dulces, suelo, aguas saladas...). Se utiliza en numerosos estudios, especialmente de genética molecular, debido a una serie de características como son: facilidad de cultivo, rápido crecimiento, posibilidad de reproducción sexual y ser haploides.

### 3.2 Cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*

Los cultivos de *C. reinhardtii*, se realizan en medio TAP inorgánico, Tris-acetate-phosphate (Gorman y Levine, 1965; Harris, 2009), cuya formulación de macronutrientes es la siguiente:

NaNO <sub>3</sub>	375 mg L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	100 mg L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	50 mg L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	108 mg L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	54 mg L <sup>-1</sup>

El medio de cultivo se prepara en agua destilada natural y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

A este medio se le añaden en condiciones estériles 3 mL L<sup>-1</sup> de una solución *stock* de oligoelementos y vitaminas (Fábregas *et al.*, 1984), para dar las siguientes concentraciones finales:

Tiamina	35 µg L <sup>-1</sup>
Biotina	5 µg L <sup>-1</sup>
Vitamina B <sub>12</sub>	3 µg L <sup>-1</sup>
Citrato férrico	20 µM
ZnCl <sub>2</sub>	1 µM
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1 µM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	1 µM
CoCl <sub>2</sub>	0.1 µM
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.1 µM

Los cultivos *stock* se realizan en botellas *Pyrex* de 500 mL y se mantienen en condiciones de aireación en una cámara de cultivo, bajo condiciones lumínicas y térmicas controladas. La iluminación, de  $68,25 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , es proporcionada por tubos fluorescentes *Philips TLD* de 36 W, aplicada con un ciclo de luz oscuridad de 12 horas cada uno. La temperatura se mantiene constante a  $18 \pm 1^\circ\text{C}$ . El aire inyectado a los cultivos es filtrado por filtros Millipore FG de  $0.20 \mu\text{m}$  de tamaño de poro. Con esta aireación continua se evita la sedimentación de las células por lo que todas las células reciben el mismo aporte de luz, minerales y gases, para conseguir un crecimiento más uniforme (Raven y Geider, 1988).

### 3.3 Preparación de la solución *stock* de atrazina

Se prepara una solución *stock* de atrazina a partir de un producto comercializado por Sigma-Aldrich. La solución *stock* se prepara en tubos *Kimax* de 50 mL esterilizados previamente en autoclave. La atrazina pura comercial se disuelve en metanol, a una concentración 5 mM. Todos los cultivos ensayados, incluidos los blancos, tuvieron la misma concentración de metanol puro, la cual se comprobó previamente que no tiene efecto sobre las células.

A partir de esta solución *stock* se preparan las distintas concentraciones que se van a ensayar sobre *Chlamydomonas reinhardtii*. En todos los casos las concentraciones fueron verificadas en el Laboratorio de Técnicas Cromatográficas de los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de A Coruña tanto inicialmente, antes de la inoculación, como a lo largo del cultivo para asegurar que no se producía una degradación del herbicida. Para la determinación se realizó una extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos C18 y análisis mediante cromatografía de gases con detección mediante espectrometría de masas (Thermo Finnigan Polaris Q). Las condiciones analíticas fueron las siguientes:

- Columna: J&W, DB-XLB 60 m x 0.25 mm x 0.25 mm
- Inyección: Modo PTV. Volumen de inyección: 9 mL; temperatura:  $50^\circ\text{C}$ ; tiempo de splitless: 0.20 min; flujo de splitless:  $20 \text{ mL min}^{-1}$ ; velocidad de transferencia:  $3.33^\circ\text{C s}^{-1}$ . Temperatura final:  $300^\circ\text{C}$  (15 minutos).

- Elución: 40°C (5 minutos) a 200°C a 10°C min<sup>-1</sup> a 300°C a 30°C min<sup>-1</sup> a 300°C (10 minutos). Flujo constante a 1 mL min<sup>-1</sup>. Línea de transferencia 290 °C
- Detección: SIR (Selected Ion Recording).

### 3.4 Determinación de la densidad celular

La densidad celular, expresada en células mL<sup>-1</sup>, se determinó mediante citometría de flujo, en un citómetro Gallios (Beckman Coulter Inc.) equipado con un láser de argón como fuente de luz, que emite a 488 nm (luz azul). Para ello, se empleó la suspensión de fluorosferas de calibrado, *Flow-Count Fluorospheres* (Beckman Coulter Inc.), con una concentración y rango de emisión de fluorescencia conocidos.

Las tasas de crecimiento para cada tiempo y concentración de herbicida empleada (T.C.) expresadas en días<sup>-1</sup>, fueron calculadas mediante la siguiente fórmula:

$$T.C. = [\log(N_t) - \log(N_0)] / (t - t_0)$$

donde ( $t_0$ ) y ( $t$ ) son el tiempo inicial y final del periodo estudiado respectivamente, ambos expresados en días, y ( $N_t$ ) y ( $N_0$ ) el número de células mL<sup>-1</sup> en esos tiempos.

La Concentración Inhibitoria Media (*Inhibitory Concentration 50%*, IC50), es decir, la concentración de la sustancia ensayada necesaria para causar una inhibición del 50% en el crecimiento con respecto al control, se obtiene mediante interpolación gráfica en las curvas dosis-respuesta, donde en el eje de abscisas se sitúa el logaritmo de las concentraciones de herbicida empleadas y en el eje de ordenadas la inhibición del crecimiento de los cultivos expuestos al herbicida. El resultado se expresa en porcentaje con respecto al crecimiento de los cultivos control. Los datos para el cálculo de las IC50 se ajustaron mediante una ecuación sigmoideal de cuatro parámetros utilizando el programa Sigma Plot versión 12.0 (Systat Software Inc., Chicago).

### 3.5 Determinación espectrofotométrica de pigmentos fotosintéticos

Para el análisis espectrofotométrico de los pigmentos de *C. reinhardtii* se recogen las células por centrifugación de un volumen determinado de cultivo de densidad celular conocida en una centrífuga refrigerada ALC PK121R a 8000g durante 20 min a 4°C.

Posteriormente, se retira el sobrenadante y la biomasa se resuspende en un volumen conocido de acetona al 90% (v:v), manteniéndola de este modo durante 24 h a 4 °C y en oscuridad para que la extracción de los pigmentos fotosintéticos sea completa. Pasadas las 24h, se centrifugan de nuevo para eliminar los restos celulares, obteniéndose de este modo en el sobrenadante los pigmentos extraídos de las células. Se lee la absorbancia de este sobrenadante frente a un blanco de acetona al 90% a 664, 647 y 480 nm en un espectrofotómetro Shimazu UV-1700.

El valor de los coeficientes y la longitud de onda a la cual se produce la máxima absorción varían en función del solvente utilizado (Parsons y Strickland, 1965; Goodwin y Britton, 1988) y de la microalga empleada. De los propuestos hasta ahora, se han adoptado los de Jeffrey y Humphrey (1975) para las clorofilas, y los de Strickland y Parsons (1972) para los carotenoides totales, ambos usando acetona al 90% como solvente.

Las ecuaciones empleadas para el cálculo de las concentraciones de pigmentos en el extracto son:

$$\text{Clorofila } a = 11.93 A_{664} - 1.93 A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b = 20.36 A_{647} - 5.50 A_{664}$$

$$\text{Carotenoides totales} = 4.0 A_{480}$$

en las cuales, las clorofilas *a* y *b* y carotenoides totales representan concentraciones de dichos pigmentos en  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de extracto, y  $A_{664}$ ,  $A_{647}$  y  $A_{480}$  representan las absorbancias medidas a 664, 647 y 480 nm, respectivamente.

### **3.6 Determinación de proteínas hidrosolubles**

Para la cuantificación de la concentración de proteínas hidrosolubles de *C. reinhardtii* se ha elegido el método de Bradford (1976).

La base de este método es el cambio de color diferencial del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en respuesta a diferentes concentraciones proteicas. El máximo de absorbancia para una solución ácida de dicho colorante cambia de 465 a 595 nm cuando se produce el enlace a una proteína. Este método cuantifica proteínas y polipéptidos cuyo peso molecular sea superior a 3 kDa.

En este trabajo se ha utilizado el reactivo preparado comercialmente por BioRad en el producto *Protein Assay Kit*.

Las células de *C. reinhardtii* se recogen por centrifugación de un volumen determinado de cultivo de densidad celular conocida en una centrífuga refrigerada ALC PK121R a 8000 g durante 20 min a 4°C. Se retira el sobrenadante y el precipitado se resuspende en un volumen conocido de tampón 0.5 x PBS pH 7.2 estéril y a 4°C. Esta suspensión celular se somete a tres ciclos de sonicación de dos minutos cada uno en un sonicador LABSONIC con el objetivo de conseguir la ruptura de la pared celular de las células microalgales y que, de ese modo, liberen su contenido celular. A continuación, se centrifuga de nuevo para retirar los restos celulares. El extracto celular se diluye convenientemente con el mismo tampón utilizado en la extracción y se cuantifica su contenido proteico. Para ello, se prepara una recta de calibrado con concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) entre 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en tampón 0.5 x PBS pH 7.2 frente a un blanco también de tampón. La reacción colorimétrica se inicia añadiendo colorante azul de Coomassie en una relación muestra:reactivo 4:1 (v:v) a cada una de las muestras y agitando suavemente. Las medidas de absorbancia se realizan en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 a 595 nm.

Todo el proceso de extracción se realiza inmediatamente antes del análisis del contenido proteico.

### **3.7 Análisis elemental**

La composición elemental (carbono y nitrógeno) se analizó sobre muestras de biomasa liofilizada empleando un analizador elemental.

La biomasa se recoge por centrifugación de un volumen determinado de cultivo de densidad celular conocida a 8000 g durante 20 min a 4°C en una centrifuga refrigerada ALC PK121R. Se retira el sobrenadante y se lava la biomasa dos veces con PBS 0.5X. Posteriormente, la biomasa se congela a -80°C para ser liofilizada en un liofilizador Telstar Crydos 50 durante 48h antes de la realización del análisis.

Este análisis consiste en la oxidación instantánea y completa de la muestra, que resulta en la conversión de todas las moléculas orgánicas e inorgánicas en productos de

combustión. Para esto, se pesan entre 1-2 mg de cada una de las muestras liofilizadas y se introducen en cápsulas de estaño a las que se les aplica la combustión instantánea en un tubo de cuarzo relleno de óxido de wolframio y cobre, que se mantiene a 1020°C. Los gases resultantes de dicha combustión pasan a través de un horno de reducción a 650°C, transportados por una corriente de helio de flujo 100 mL min<sup>-1</sup>. Después, la muestra de gases generados en este proceso es arrastrada por un gas transportador, helio, hacia una columna cromatográfica (Porapak PQS) a 60°C, en la cual serán separados para su detección por un detector de conductividad térmica.

El análisis elemental de las muestras se ha realizado en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de Análisis de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña. Para la realización de los análisis se utiliza un autoanalizador EA1108 (*Carlo Erba Instruments*), acoplado a un detector de conductividad térmica (DCT), un introductor de muestras automático y con una unidad de procesado EAGER 200. El instrumento se calibra con sulfanilamida, estándar aconsejado para muestras con elevado contenido orgánico, y la concentración de las muestras se calcula mediante un algoritmo de regresión lineal en base al área de los picos generados por el detector.

### **3.8 Determinación espectrofotométrica de la actividad nitrato reductasa**

La actividad nitrato reductasa es analizada mediante la determinación colorimétrica del nitrito formado como consecuencia de la reducción enzimática de nitrato en presencia de NADH como donador de electrones (Barea y Cárdenas, 1975; Berges y Harrison, 1995).

Para ello, se recogen las células de *C. reinhardtii* por centrifugación de un volumen determinado de cultivo de densidad celular conocida en una centrífuga refrigerada ALC PK121R a 8000 g durante 10 min a 18 °C, se elimina el sobrenadante y la biomasa se somete a dos lavados en tampón 0.5 x PBS pH 7.2 para eliminar por completo el medio de cultivo, que contiene nitrato como fuente de nitrógeno, el cual puede interferir en el análisis. Tras esto, las células se permeabilizan con tolueno 1:50 (v:v) y a continuación se añade la mezcla de reacción que contiene concentraciones finales de 100 mM tampón Tris-HCl pH 7.5, 0.3 mM β-NADH y 10 mM KNO<sub>3</sub>. La reacción se inicia con la adición del KNO<sub>3</sub> e inmediatamente se lleva a cabo una incubación a 30 °C durante 10

minutos. Pasado este tiempo, se detiene la reacción mediante la adición de acetato de zinc a una concentración final de 0.37 M con agitación vigorosa de las suspensiones; el acetato de zinc hace precipitar los nucleótidos de piridina, que podrían interferir en la posterior determinación de nitrito (Eppley, 1978). Las células se retiran por centrifugación y se determina espectrofotométricamente la concentración de nitrito en el sobrenadante, al cual se le añaden 20  $\mu$ L de metosulfato de fenazina 125  $\mu$ M para oxidar posibles restos de NADH. Simultáneamente a este proceso, se preparan blancos en los que la reacción se detiene inmediatamente tras la adición del  $\text{KNO}_3$ , de modo que no se produce nitrito. De este modo, se puede calcular la cantidad de nitrito formado por diferencia entre la cantidad de nitrito obtenida en los blancos y la cantidad de nitrito presente tras la incubación. La determinación espectrofotométrica del nitrito se realiza por el método de Snell y Snell (1949), el cual se basa en una reacción de diazotación con sulfanilamida, cuyo producto se une a la N(-naftil)etilendiamina para formar un complejo de color rosa, de modo que la cantidad de nitrito presente será mayor cuanto más intensa sea la coloración obtenida. A 1 mL de muestra se le añaden 1 mL de sulfanilamida al 1% (p:v) en HCl 2.5 M y 1 mL de N(-naftil)etilendiamina al 0.02% (p:v) en agua destilada. Se espera 10 min para que se produzca la reacción y tras esto se realizan lecturas de absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700. Estas absorbancias se convierten en concentraciones de nitrito por interpolación gráfica en una recta de calibrado empleando concentraciones conocidas de nitrito y en condiciones idénticas a las del ensayo.

### **3.9 Análisis estadístico**

Para todos los parámetros analizados, se calculan las medias y las desviaciones estándar de cada tratamiento y de los controles.

Para el tratamiento estadístico de los datos se utiliza el programa SPSS Statistic versión 21.0.0 (SPSS Ibérica, España). Para determinar si existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos los datos se analizan estadísticamente mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) a un nivel de confianza del 95%. Cuando se observan diferencias significativas, las medias se comparan mediante un test de comparaciones múltiples de Tukey ( $P < 0.05$ ).

Las gráficas se realizan con el paquete de análisis estadístico y de gráficas avanzadas SigmaPlot versión 12.0 (Systat Software Inc., Chicago).

### 3.10 Diseño experimental

Para evaluar los potenciales efectos tóxicos de la atrazina sobre la microalga *C. reinhardtii* se realizaron experiencias de 96 horas de duración en las que las células se expusieron a distintas concentraciones de herbicida: 0.1  $\mu\text{M}$ , 0.25  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{M}$ . Además se utilizaron controles libres de herbicida.

Los cultivos se establecieron a partir de un inóculo en fase de crecimiento exponencial y se realizaron en botellas Pyrex de 500 mL conteniendo 450 mL de cultivo, a una densidad inicial de  $40 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Se realizaron dos réplicas de cada cultivo. Diariamente se tomaron muestras de cada uno de los cultivos para la determinación de la densidad celular y el análisis de pigmentos fotosintéticos. Asimismo, se realizaron análisis de proteínas a las 48 y 96 horas, y análisis de composición elemental y actividad nitrato reductasa a las 96 horas de cultivo.



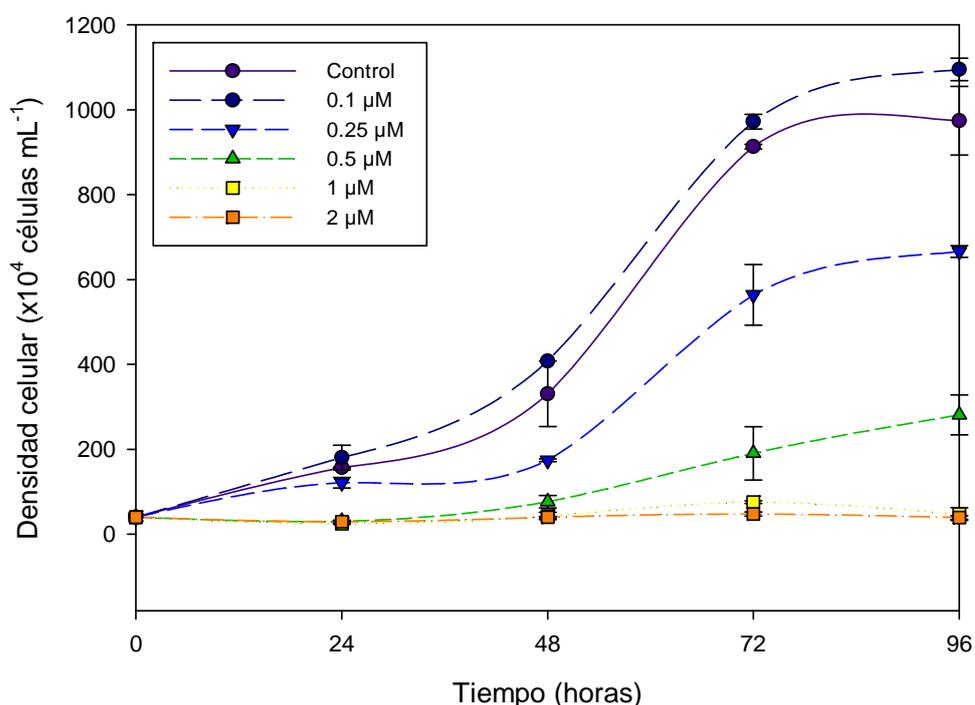
**Figura 3.** Cultivos de *C. reinhardtii* sometidos a distintas concentraciones de atrazina (0.1; 0.25; 0.5; 1; 2  $\mu\text{M}$ ) y los controles libres de herbicida

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Crecimiento de *Chlamydomonas reinhardtii*

El crecimiento de *C. reinhardtii* se ve negativamente afectado por la presencia del herbicida atrazina en el medio de cultivo, tal y como reflejan las curvas de crecimiento de los cultivos microalgales expuestos a las distintas concentraciones de atrazina (Figura 4). Este efecto es dependiente de la concentración, de modo que cuanto mayor es la concentración del herbicida en el medio de cultivo mayor es la inhibición del crecimiento.

Este efecto tóxico se observa ya desde las 24 horas de exposición y va aumentando hasta las 96 horas. Las concentraciones más altas de herbicida ensayadas (1 y 2  $\mu\text{M}$ ) incluso inhiben por completo el crecimiento en todo el periodo de estudio, ya que se obtienen densidades celulares finales de  $65.4 \times 10^4$  y  $39 \times 10^4$ , respectivamente, cuando hemos partido de un inóculo de  $40 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ .



**Figura 4.** Curvas de crecimiento de los cultivos de *C. reinhardtii* en ausencia (Control) y presencia de distintas concentraciones de atrazina. Los valores representados se corresponden con la media de las dos réplicas de cada tratamiento  $\pm$  la desviación estándar

A las 96 horas, existen diferencias significativas en la densidad celular final alcanzada en los diferentes cultivos respecto al control ( $p < 0.05$ ); al comparar por grupos se obtiene la siguiente ordenación:

$$\text{Control} = 0.1 < 0.25 < 0.5 < 1 = 2$$

Por tanto, todos los cultivos presentan diferencias entre sí ( $p < 0.05$ ), con excepción del cultivo control con el cultivo de la menor concentración de atrazina ensayada ( $0.1 \mu\text{M}$ ) y entre los dos cultivos con las concentraciones más altas ensayadas ( $1$  y  $2 \mu\text{M}$ ).

Estos resultados coinciden con los observados en otros estudios en los que la densidad celular en cultivos de *Chlorella vulgaris* no se ve afectada a bajas concentraciones de herbicidas tipo triazina como es el terbutryn (Rioboo *et al.*, 2002). Otros trabajos, por el contrario, exponen que a bajas concentraciones de herbicida el crecimiento microalgal puede sufrir incluso un efecto estimulador como es el caso de *Chlamydomonas eugametos* expuesta paraquat (Franqueira *et al.*, 1999), que no se ha observado en el presente estudio.

La tabla 1 muestra la tasa de crecimiento a las 48 horas y 96 horas de cultivo calculada tal y como se indica en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos. La tasa de crecimiento a las 48 horas disminuye significativamente con respecto al control en los cultivos de concentraciones iguales o superiores a  $0.25 \mu\text{M}$  de atrazina ( $p < 0.05$ ). La tasa de crecimiento a las 96 horas de exposición al herbicida disminuyó significativamente con respecto al cultivo control en los cultivos de concentraciones iguales o superiores a  $0.5 \mu\text{M}$  de atrazina.

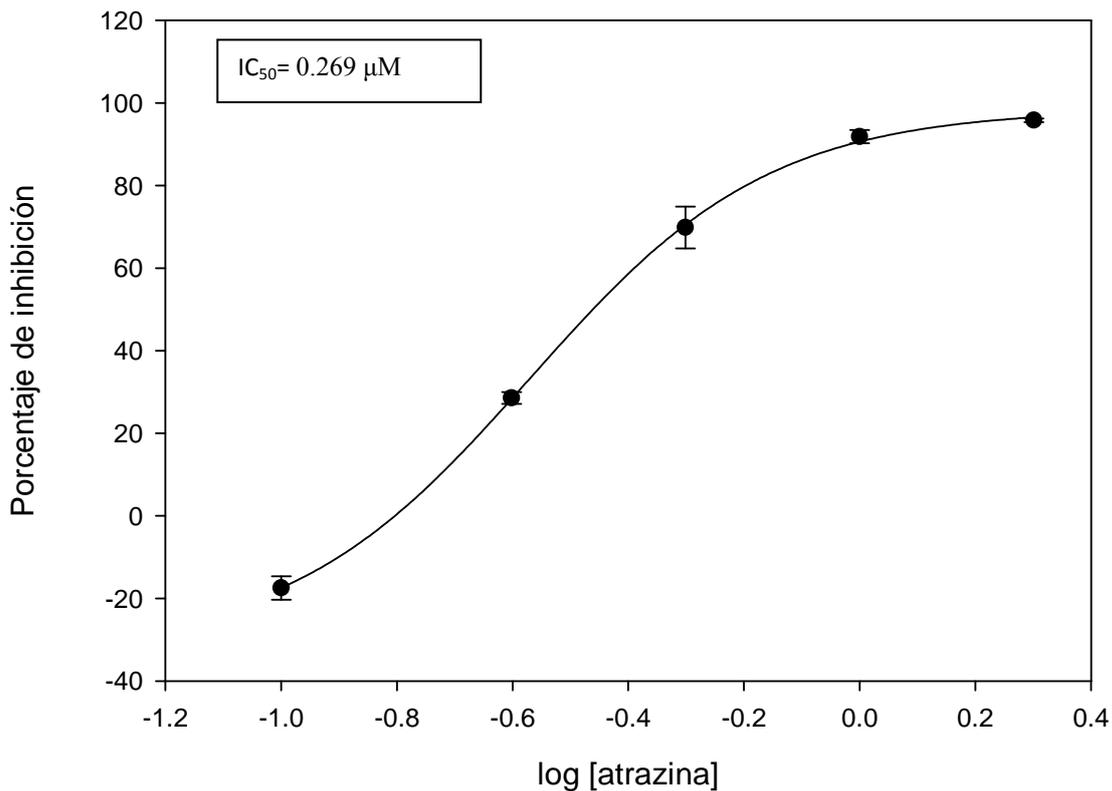
**Tabla 1.** Tasa de crecimiento de los cultivos de *C. reinhardtii* expresada en  $\text{día}^{-1}$  tras 48 h y 96 h de exposición para cada concentración de herbicida. Los valores representan la media de las dos réplicas  $\pm$  la desviación estándar. Los asteriscos representan diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ )

Atrazina $\mu\text{M}$	TC	
	48h	96h
Control	$0.46 \pm 0.09$	$0.35 \pm 0.04$
0.1	$0.50 \pm 0.07$	$0.36 \pm 0.00$
0.25	$0.32 \pm 0.05$ *	$0.30 \pm 0.05$
0.5	$0.14 \pm 0.07$ *	$0.21 \pm 0.07$ *
1	$0.01 \pm 0.10$ *	$0.07 \pm 0.06$ *
2	$0.00 \pm 0.04$ *	$0.00 \pm 0.09$ *

Estos datos indican que la atrazina a elevadas concentraciones ( $> 0.5 \mu\text{M}$ ) presenta una acción más aguda a las 48 horas que a las 96 horas (Tabla 1). Asimismo, parece que el herbicida ensayado muestra un efecto algistático. Un comportamiento similar de las tasas de crecimiento a las 48 h y 96 h se observó en cultivos de *Chlorella vulgaris* expuestos a los herbicidas isoproturon y terbutryn (Rioboo *et al.*, 2002).

En los últimos años, se han desarrollado bioensayos basados en nuevos parámetros y métodos más rápidos, prácticos y sensibles para la detección y estudio toxicológico de contaminantes. No obstante, el crecimiento sigue siendo el parámetro más utilizado hasta la fecha para estudiar los efectos de compuestos tóxicos sobre las microalgas en ensayos de toxicidad crónicos (van Wezel y van Vlaardingen, 2004). Entre los diferentes índices que se pueden emplear para evaluar el efecto de los contaminantes sobre el crecimiento microalgal, permitiendo la comparación de resultados obtenidos bajo diferentes condiciones en diferentes laboratorios, el valor de la IC50 (*Inhibitory Concentration 50%*) es el más utilizado en los ensayos de toxicidad (Leboulanger *et al.*, 2001).

En este estudio, la toxicidad de la atrazina se ha calculado mediante una curva dosis-respuesta en la que se representa el porcentaje de inhibición del crecimiento en relación a un control sin herbicida frente al logaritmo de la concentración del herbicida. La curva de concentración-respuesta obtenida en base a la tasa de crecimiento de los cultivos presenta una respuesta de tipo sigmoidea (Figura 5). Mediante la correspondiente ecuación de cuatro parámetros se calculó el valor de la IC50 a las 96 horas. El valor obtenido para esta IC50 fué  $0.269 \mu\text{M}$  de atrazina.



**Figura 5:** Curva dosis-respuesta en la que se representa la inhibición del crecimiento, expresado en porcentaje con respecto al control frente al logaritmo de la concentración del herbicida tras 96h de exposición

Esta curva presenta un descenso en la tasa de crecimiento a una determinada concentración umbral de herbicida, fenómeno que se ha descrito en otros organismos acuáticos en presencia de un tóxico (Franklin *et al.*, 2000). Esto indica que, a partir de un valor umbral donde los mecanismos de defensa celular ya no son efectivos, incrementos en la concentración de atrazina provocan marcados efectos sobre la tasa de crecimiento. Este efecto ha sido descrito en la bibliografía con el uso de distintos herbicidas (terbutryn y paraquat) en diferentes microalgas como *Chlorella vulgaris* o *Chlamydomonas moewusii* (Rioboo *et al.*, 2002; Prado, 2010). La curva de concentración-respuesta obtenida para *C. reinhardtii* se ajustó a un modelo de regresión logístico de cuatro parámetros ( $r^2 = 0.99$ ) (Figura 5), modelo que ya ha sido utilizado para describir la interacción entre determinados tóxicos y diversos organismos acuáticos (Chevre *et al.*, 2005).

Los valores de  $IC_{50}$  (96 horas) obtenidos en este estudio están dentro del rango de valores publicados en la literatura para diferentes especies microalgales, que se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Valores de IC50 (a distintas horas de exposición) para distintas especies microalgales expuestas a atrazina (a. Ma *et al.*, 2006; b. Bérard, *et al.*, 2003; c. Resultados obtenidos en este estudio)

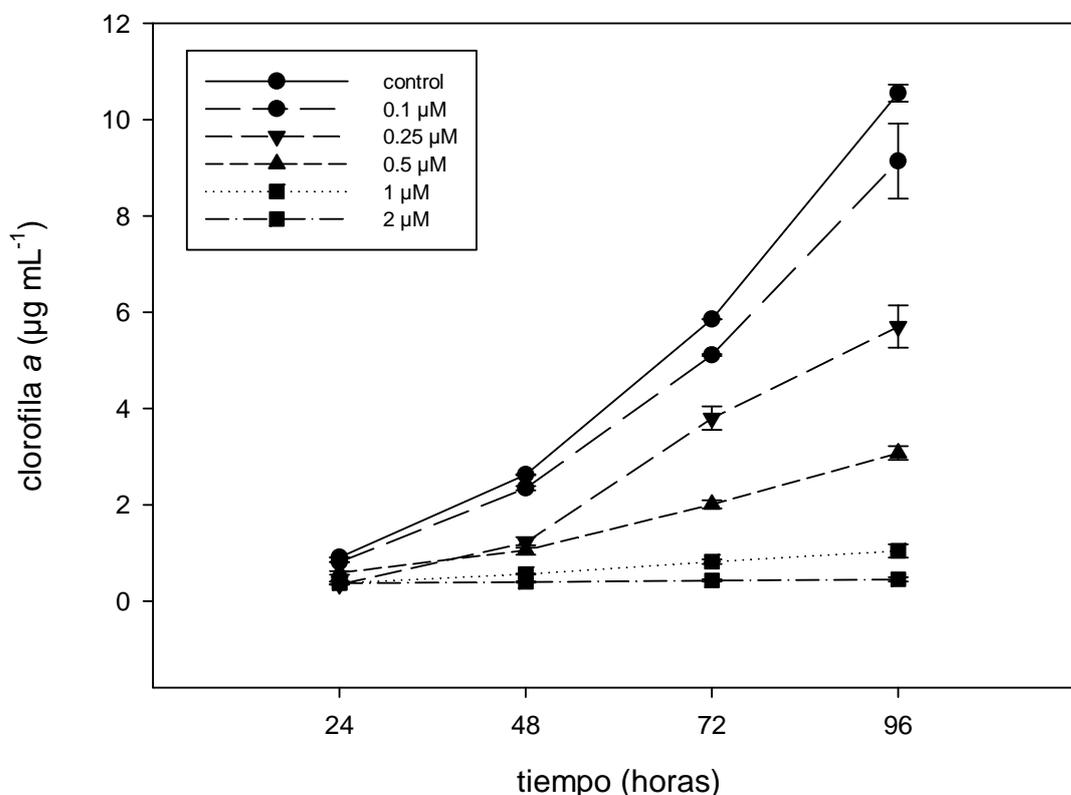
Especie	Duración del experimento (h)	Atrazina ( $\mu\text{M}$ ) IC50
<i>Chlorella vulgaris</i>	96	1.92 <sup>a</sup>
<i>Chlamydomonas intermedia</i>	144	0.157 <sup>b</sup>
<i>Chlamydomonas sp</i>	-	0.232 <sup>b</sup>
<i>Scenedesmus acutus</i>	96	0.259 <sup>b</sup>
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	96	0.533 <sup>b</sup>
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	-	0.269 <sup>c</sup>

El valor de la IC50 obtenido en el presente estudio con *Chlamydomonas reinhardtii* (0.269  $\mu\text{M}$ ) es similar al obtenido otras especies del mismo género, como *Chlamydomonas sp.* (0.232  $\mu\text{M}$ ). Este valor es menor que el obtenido en *Chlorella vulgaris* tras las mismas horas de exposición a atrazina (Tabla 2), por lo que *Chlamydomonas reinhardtii* es más sensible que *Chlorella* a este herbicida, frente a lo descrito anteriormente (Irmer *et al.*, 1986; Wong, 2000). *Pseudokirchneriella subcapitata*, anteriormente *Selenastrum capricornutum*, está incluida dentro de los bioensayos de toxicidad obligados para el registro y notificación de nuevos productos químicos, tanto en la Unión Europea como en los Estados Unidos (ISO 8692, 2012). Sin embargo, como se observa en la Tabla 2, *Chlamydomonas reinhardtii* es más sensible en el caso de este herbicida. Dado que esta especie es fácil de cultivar y manipular y se utiliza como modelo en genética molecular, podría contemplarse su utilización en estos bioensayos una vez que se amplíe el conocimiento sobre su comportamiento con otros compuestos químicos.

#### 4.2 Pigmentos fotosintéticos de *Chlamydomonas reinhardtii*

El contenido de pigmentos es frecuentemente utilizado como biomarcador de exposición a diversos tóxicos en microalgas (Couderechet y Vernet, 2003). Asimismo, en numerosos estudios en ecosistemas naturales se realiza la estimación del crecimiento microalgal en función de la concentración de clorofila *a* (Debenest *et al.*, 2010).

La concentración de clorofila *a* por volumen de cultivo a lo largo de 96 horas de exposición a atrazina se representa en la Figura 6.



**Figura 6:** Concentración de clorofila *a* ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de los cultivos de *C. reinhardtii* en ausencia (Control) y presencia de distintas concentraciones de atrazina. Los valores representados se corresponden con la media de las dos réplicas de cada tratamiento  $\pm$  la desviación estándar

La atrazina afecta negativamente al contenido de clorofila *a* de los cultivos de *C. reinhardtii*. Este efecto tóxico va aumentando con el tiempo hasta las 96 horas y es dependiente de la concentración, de modo que cuanto mayor es la concentración del herbicida en el medio de cultivo menor es la concentración de clorofila *a* del mismo, con valores máximos en los cultivos control ( $10.55 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y mínimos en los cultivos con las concentraciones más altas de herbicida ensayadas (1 y 2  $\mu\text{M}$ ) ( $1.04$  y  $0.45 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente), en los que se inhibe por completo la síntesis de clorofila *a* en todo el periodo de estudio (Figura 6).

A las 96 horas, existen diferencias significativas en el contenido final de clorofila *a* por volumen de cultivo en los cultivos con atrazina respecto al control ( $p < 0.05$ ); al comparar por grupos, se obtiene la siguiente ordenación:

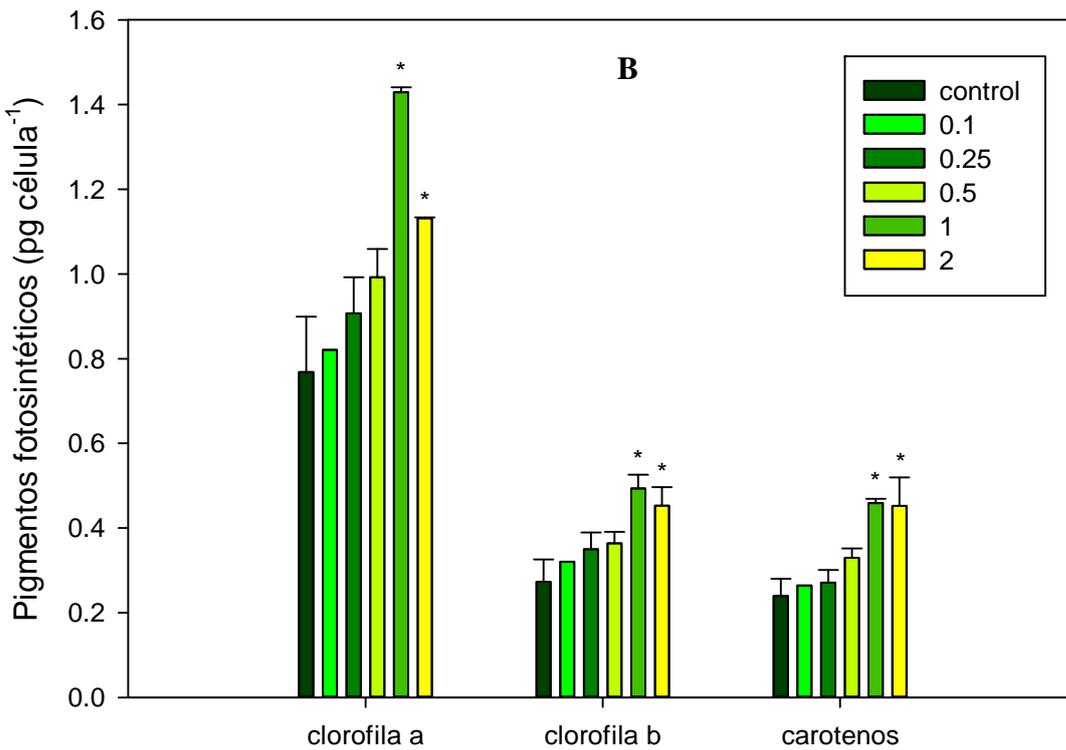
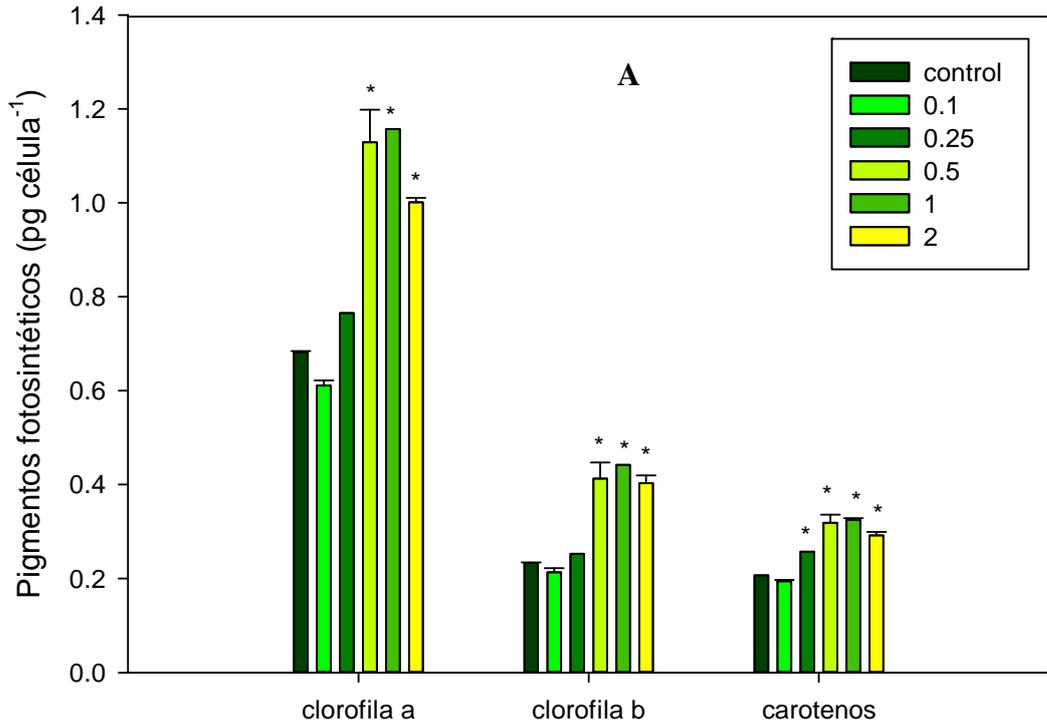
$$\text{Control} < 0.1 < 0.25 < 0.5 < 1 = 2$$

Por tanto, todos los cultivos presentan diferencias significativas con respecto el control y entre sí ( $p < 0.05$ ) salvo los dos cultivos con las concentraciones más altas de atrazina ensayadas entre sí (1 y 2  $\mu\text{M}$ ).

Estos resultados muestran un desajuste entre el crecimiento y el contenido en clorofila *a* en los cultivos con una concentración de atrazina de 0.1  $\mu\text{M}$  con respecto al control. No hay diferencias significativas en las medidas de densidad celular de estos dos cultivos (Figura 4), mientras que en el caso del contenido en clorofila *a* en  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sí existen diferencias significativas entre ambos. Este fenómeno ya ha sido descrito como una diferencia de sensibilidad entre el crecimiento y la fotosíntesis en microalgas como respuesta a bajas concentraciones de un agente tóxico, como el cobre (Cid *et al.*, 1995; Nalewajko y Olavenson, 1995; Perales-Vela *et al.*, 2007) u otras triazinas como el terbutrin (Rioboo *et al.*, 2008). En diversos estudios ecotoxicológicos se concluye que el crecimiento es menos sensible que otros parámetros como la morfología celular o la producción fotosintética, porque la inhibición del crecimiento refleja un valor medio de la población estudiada sin tener en cuenta la respuesta que se produce a nivel celular (Geoffroy *et al.*, 2007).

Puesto que los cambios ambientales afectan directamente a las células, antes de que se manifieste el efecto sobre la población, resulta conveniente la medida de parámetros celulares, como la concentración de pigmentos fotosintéticos, clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides.

Los contenidos celulares en clorofilas *a* y *b* y carotenoides de los cultivos de *C. reinhardtii* a las 48 y 96 horas de exposición a las distintas concentraciones de atrazina se representan en la Figura 7.



**Figura 7:** Pigmentos fotosintéticos de los cultivos de *C. reinhardtii* expresados en picogramos célula<sup>-1</sup> a las (A) 48 horas y (B) 96 horas de exposición a distintas concentraciones de atrazina. Los asteriscos representan las diferencias significativas

El contenido celular de pigmentos fotosintéticos se ve significativamente afectado ya a las 48 horas de exposición a la atrazina (Figura 7A). Concentraciones iguales o superiores a 0.5  $\mu\text{M}$  de atrazina producen un incremento significativo con respecto al control ( $p < 0.05$ ) en el contenido celular de clorofilas y carotenoides. En el caso de los carotenoides este efecto se produce ya en los cultivos con una concentración de atrazina de 0.25  $\mu\text{M}$ .

A las 96 horas de exposición a atrazina, este aumento significativo en el contenido celular de pigmentos fotosintéticos en *C. reinhardtii* con respecto al control, se observa a concentraciones iguales o superiores a 1  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) (Figura 7B).

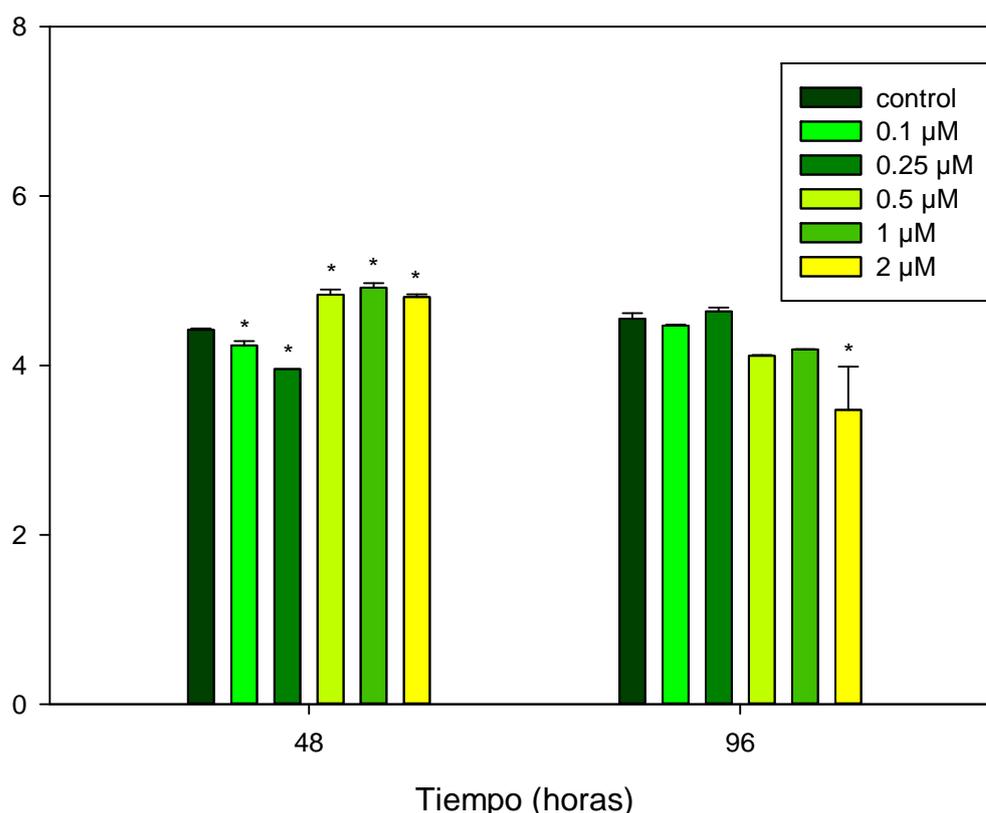
Clorofilas y carotenoides están presentes en complejos proteicos en las membranas de los tilacoides, donde interactúan mutuamente y juegan múltiples roles en la fotosíntesis (Tukaj *et al.*, 2003).

Existen estudios en los que se describe que la atrazina y otras triazinas como el Irgarol 1051 no provocan cambios importantes en la cantidad de clorofilas (Macinnis-Ng y Ralph, 2003; Saladin *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en este estudio, por el contrario, exponen que la concentración celular de pigmentos fotosintéticos experimenta un aumento significativo en presencia de atrazina tanto a las 48 horas de exposición como a las 96 horas. El incremento de contenido de clorofilas por exposición a triazinas ha sido descrito en otras especies de microalgas como *Selenastrum capricornutum* o *Chlorella vulgaris* (Rioboo *et al.*, 2002), también ha sido descrito en *Chlamydomonas moewusii* expuesta a paraquat (Prado *et al.*, 2009). Este proceso puede ser el resultado de un mecanismo homeostático desencadenado por la exposición al herbicida. Las respuestas como la síntesis de los componentes de los tilacoides son consideradas como una respuesta general de adaptación a las situaciones en las que la tasa de transporte de electrones está fuertemente limitada por la fotosíntesis (Behra *et al.*, 1999).

El incremento en el contenido celular de carotenoides se puede considerar un indicador del carácter protector de estos frente al estrés oxidativo (Ünyayar *et al.*, 2005), dado que los carotenoides, además de actuar como pigmentos accesorios en la fotosíntesis, son potentes agentes secuestradores de las especies reactivas de oxígeno y forman parte de los mecanismos antioxidantes que actúan en la célula ante diversos factores de estrés.

La relación clorofila total/carotenoides ha sido descrita como un buen indicador de estrés en plantas (Hendry y Price, 1993), habiéndose aplicado también a microalgas (Prado, 2010).

La relación clorofila *a* + clorofila *b*/carotenoides en los cultivos de *C. reinhardtii* a las 48 y 96 horas de exposición a distintas concentraciones de atrazina se representan en la Figura 8. A las 48 horas de exposición esta relación aumenta significativamente con respecto a la observada en los cultivos control ( $p < 0.05$ ) a medida que aumenta la concentración de atrazina en el medio, excepto en el cultivo con 0.25  $\mu\text{M}$  de atrazina. Mientras que a las 96 horas solo existe una reducción significativa de esta relación con respecto al control ( $p < 0.05$ ) en los cultivos con una concentración de 2  $\mu\text{M}$  de atrazina.



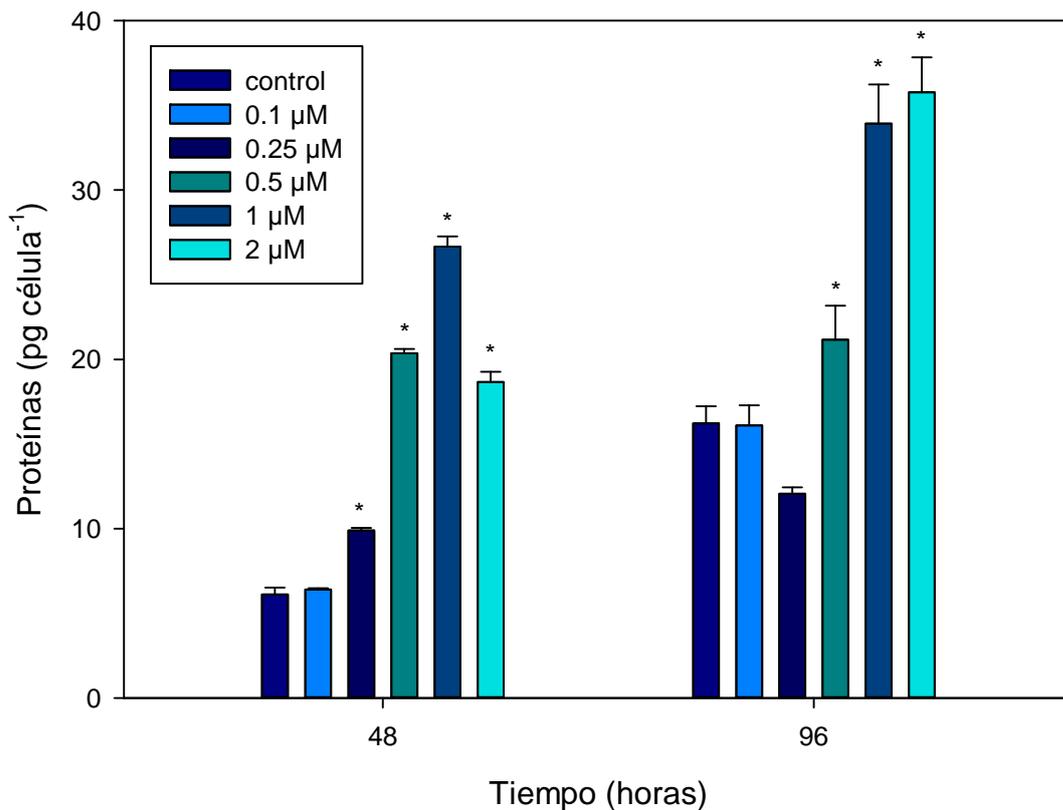
**Figura 8:** Relación clorofilas *a* + *b*/carotenoides en los cultivos de *C. reinhardtii* a las 96 horas de exposición a distintas concentraciones de atrazina. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto al control ( $p < 0.05$ )

Por tanto, se produce un cambio en la tendencia entre las 48 y 96 horas de exposición a atrazina: la relación clorofilas/carotenoides tiende a aumentar con el incremento de la concentración de atrazina a las 48 horas de exposición pasando a estabilizarse a las 96 horas excepto en los cultivos con la concentración de atrazina más alta de las ensayadas. La relación clorofilas/carotenoides también se mantuvo constante en cultivos de *Chlorella vulgaris* expuestos a otra triazina (terbutryn) (Rioboo, 2008), así como en *Chlamydomonas moewusii* expuesta a un herbicida tipo bipiridílico (paraquat), (Prado, 2010). Este fenómeno también ha sido observado como respuesta a concentraciones bajas de metales (Soldo *et al.*, 2005). Por otro lado, valores reducidos para la relación clorofilas/carotenoides, como los obtenidos en los cultivos con 2  $\mu\text{M}$  de atrazina, también se han relacionado con el estrés y los daños en el aparato fotosintético (Lichtenthaler y Buschmann, 2001).

#### **4.3 Proteínas de *Chlamydomonas reinhardtii***

El estrés oxidativo es una respuesta común a cualquier estrés ambiental y uno de los componentes celulares particularmente sensibles al daño oxidativo son las proteínas (Davies, 1987), de ahí que otro parámetro frecuentemente estudiado en los bioensayos de toxicidad de contaminantes sea la concentración de proteínas (Valavanidis *et al.*, 2006).

La exposición al herbicida atrazina tiene como consecuencia alteraciones en el contenido proteico de *C. reinhardtii*. Tras 48 horas de exposición, la concentración celular de proteínas aumenta significativamente con respecto al control a concentraciones de atrazina iguales o superiores a 0.25  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ). Tras 96 horas de exposición, este aumento es significativo a concentraciones de atrazina iguales o superiores a 0.5  $\mu\text{M}$  (Figura 9).



**Figura 9:** Contenido celular de proteínas en el cultivo de *C. reinhardtii* a las 48 y 96 horas de exposición a diferentes concentraciones de atrazina. Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto al control ( $p < 0.05$ )

Ante situaciones de estrés, las células microalgales pueden responder derivando el flujo de carbono hacia la síntesis de proteínas, como ya observaron Tripathi y Gaur (2006) en la microalga *Scenedesmus* sp. y Rioboo *et al.* (2002) en *Chlorella vulgaris*. Asimismo, se ha sugerido que las células microalgales debido a la toxicidad de los contaminantes no serían capaces de completar su proceso de división celular, pero sí de sintetizar nuevos componentes celulares (Gonzalez-Barreiro *et al.*, 2004; Sobrino *et al.*, 2004; Geoffroy *et al.*, 2007). Un incremento en la concentración de proteínas podría estar también asociado con un mecanismo de detoxificación, como se ha encontrado en casos de exposición a otros herbicidas como la simazina (Kruglov y Paromenskaja, 1970).

#### 4.4 Análisis elemental de *Chlamydomonas reinhardtii*

Si bien la fotosíntesis es la diana primaria del efecto tóxico de la atrazina, es importante identificar los potenciales efectos tóxicos a otros niveles moleculares de este herbicida sobre *C. reinhardtii* para caracterizar los mecanismos celulares de respuesta ante este contaminante así como para determinar posibles biomarcadores de exposición.

El análisis de la composición elemental de las células de *C. reinhardtii* reflejó que la adición de diferentes concentraciones de atrazina al medio de cultivo afecta a los porcentajes de carbono y nitrógeno sobre el peso seco de *C. reinhardtii* después de 96 horas de ensayo (Tabla 3).

**Tabla 3:** Composición elemental, expresada como porcentaje respecto al peso seco, de las células de *C. reinhardtii* después de 96 horas de exposición a diferentes concentraciones de atrazina. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los valores de los cultivos control ( $p < 0.05$ )

Atrazina $\mu\text{M}$	96 horas		
	Carbono (% P. S.)	Nitrógeno (% P. S.)	Relación C/N
Control	$47.78 \pm 0.82$	$9.54 \pm 0.24$	$5.01 \pm 0.04$
0.1	$47.69 \pm 0.20$	$9.84 \pm 0.1$	$4.87 \pm 0.03$ *
0.25	$48.11 \pm 0.18$	$10.04 \pm 0.04$	$4.79 \pm 0.00$ *
0.5	$43.18 \pm 0.48$ *	$9.67 \pm 0.27$	$4.47 \pm 0.07$ *
1	$38.32 \pm 1.09$ *	$8.53 \pm 0.25$ *	$4.49 \pm 0.00$ *
2	$38.20 \pm 1.13$ *	$8.41 \pm 0.03$ *	$4.65 \pm 0.04$ *

En cuanto al porcentaje de carbono, el análisis estadístico mostró que existe un descenso significativo con respecto al control en los cultivos de *C. reinhardtii* expuestos a concentraciones iguales o superiores a  $0.5 \mu\text{M}$  de atrazina ( $p < 0.05$ ).

Después de 96 horas de exposición, la atrazina provocó, asimismo, un descenso significativo con respecto al control en el contenido de nitrógeno en las dos concentraciones más altas ensayadas ( $1$  y  $2 \mu\text{M}$ ) ( $p < 0.05$ ).

Con respecto a la relación C/N, esta es significativamente menor en todos los cultivos expuestos a atrazina respecto a los cultivos control ( $p < 0.05$ ). En cuanto a las diferencias

entre los cultivos expuestos a las distintas concentraciones de atrazina en función del análisis estadístico se establece la siguiente ordenación:

$$\text{Control} > 0.1 = 0.25 > 0.5 = 1 = 2$$

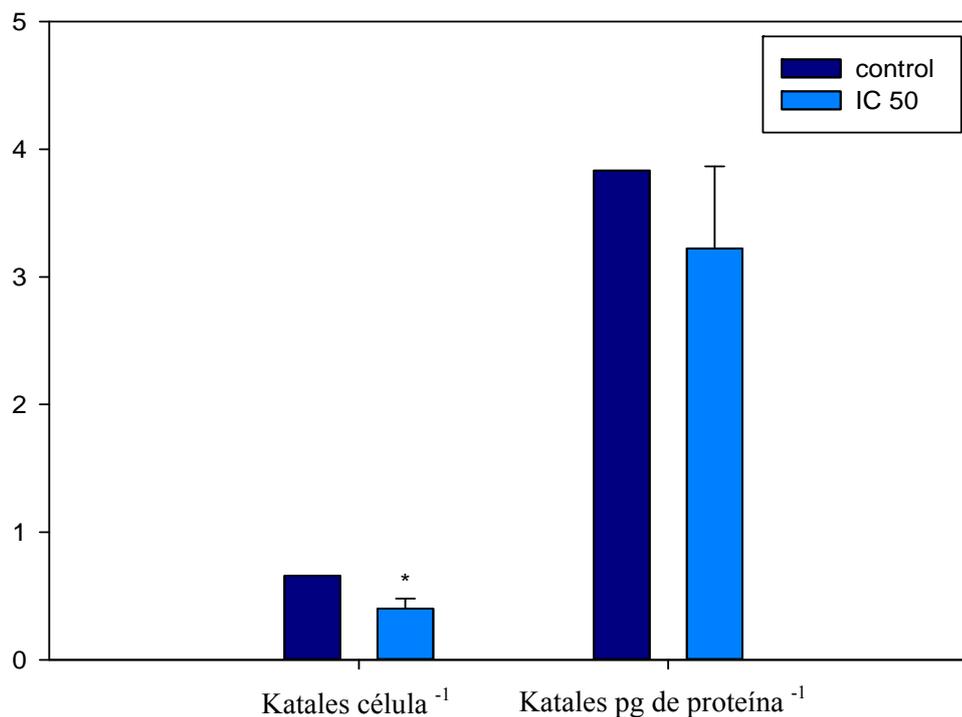
Existen, por tanto, tres grupos: los cultivos control que presentan el valor más alto de esta relación (5.01); los cultivos con concentraciones de atrazina inferiores a la IC50 (0.1 y 0.25  $\mu\text{M}$ ) con valores C/N de 4.87 y 4.79 respectivamente; y cultivos con concentraciones de atrazina superiores a la IC 50 (0.5, 1 y 2  $\mu\text{M}$ ), que presentan los valores más bajos en la relación C/N (entre 4.47 y 4.65).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos para *Chlorella vulgaris* expuesta a otro herbicida de tipo triazina (terbutryn) (Rioboo *et al.*, 2002).

#### **4.5 Determinación de la actividad nitrato reductasa de *Chlamydomonas reinhardtii***

En plantas superiores y algas, el nitrato es la principal fuente de nitrógeno para la asimilación de este elemento y durante el proceso el nitrato debe ser reducido primero a nitrito y luego a amonio por los enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa, respectivamente (Granum *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2006). Dado que la nitrato reductasa se considera uno de los enzimas más importantes dentro de las diferentes rutas biosintéticas presentes en algas (Berges, 1997), identificándose muchas veces como factor limitante en el proceso de asimilación del nitrógeno (Velasco *et al.*, 1989; Campbell y Kinhorn, 1990; Thaivanich e Incharoensakdi, 2007), este enzima ha sido objeto de numerosos estudios. Por ello, se analizó la actividad nitrato reductasa a las 96 horas en los cultivos de *C. reinhardtii* expuestos a la concentración de atrazina correspondiente a la IC50 frente a cultivos control.

La actividad nitrato reductasa de *C. reinhardtii* se ve negativamente afectada por la presencia del herbicida atrazina en el medio de cultivo (Figura 10). Tras 96 horas de exposición a atrazina, la actividad nitrato reductasa es significativamente menor en las células de *Chlamydomonas reinhardtii* del cultivo con concentración de atrazina correspondiente con la IC 50 con respecto al cultivo control ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, este efecto negativo de la atrazina no es significativo cuando se analiza la actividad nitrato reductasa en relación al contenido proteico entre estos dos cultivos (Figura 10).



**Figura 10:** Actividad nitrato reductasa, expresada como katalés célula<sup>-1</sup> y como katalés pg de proteína<sup>-1</sup> a las 96 horas de exposición a atrazina. Los asteriscos indican diferencias significativas con el cultivo control ( $p < 0.05$ )

Esta inhibición de la actividad nitrato reductasa por herbicidas se ha observado en otras microalgas (Prado *et al.*, 2009) así como en otros organismos (Kenis *et al.*, 1992). Kenis *et al.* (1992) concluyeron que este efecto depende de la producción acelerada de radicales libres oxidantes inducida por el herbicida. La nitrato reductasa es un enzima con grupos -SH en su estructura que resultan esenciales para su actividad catalítica, lo que la hace potencialmente sensible al estrés oxidativo (Luna *et al.*, 1997). Por otro lado, Casano *et al.* (1994) han sugerido que este enzima expuesto a radicales hidroxilo puede experimentar cambios en su estructura secundaria y/o terciaria, probablemente como consecuencia de reacciones de los radicales libres con residuos de triptófano, tirosina, histidina y/o cisteína.

## 5. CONCLUSIONES

1. El herbicida atrazina inhibe el crecimiento de la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii*, siendo este efecto dependiente de la concentración de herbicida y del tiempo de exposición. La IC50 a las 96 horas de exposición es 0.269  $\mu\text{M}$ .
2. El contenido celular de pigmentos fotosintéticos y proteínas de *Chlamydomonas reinhardtii* aumenta tras la exposición a atrazina, pudiendo provocar alteraciones en la fotosíntesis y en otras actividades metabólicas.
3. La atrazina afecta a la relación C/N en esta microalga que disminuye con el incremento de la concentración del herbicida en el medio.
4. La actividad nitrato reductasa se ve afectada negativamente por la presencia de atrazina en el medio a concentraciones equivalentes a la IC50.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Barea, J. L. y Cardenas, J. (1975). The nitrate-reducing enzyme system of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Arch. Microbiol.* 105: 21-25.
- Berges, D. (1997). Algal nitrate reductase. *Eur. J. Phycol.* 32: 3-8.
- Berges, J. A. y Harrison, P. J. (1995). Nitrate reductase activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: a revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 40: 82-93.
- Bérard, A., Dorigo U., Mercier, I., Becker-van Slooten, K., Grandjean, D. y Leboulanger, C. (2003). Comparison of the ecotoxicological impact of the triazines Irgarol 1051 and atrazine on microalgal cultures and natural microalgal communities in Lake Geneva. *Chemosphere* 53: 935-944.
- Behra, R, Genoni G. P., y Joseph, A. L. (1999). Effect of atrazine on growth, photosynthesis and between-strain variability in *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyceae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37: 36–41.
- Bi Fai, P., Grant, A. y Reid, B. (2007). Chlorophyll a fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 26: 1520-1531.
- Bischoff, W. H. (1959). Some observations on *Clamydomonas microhalophila* sp. NOV. *Biol. Bull.* 117: 54-62.
- Blaise, C. R. (1993). Practical laboratory applications with micro-algae for hazard assessment of aquatic contaminants. En: *Ecotoxicology Monitoring*. Richardson M. (ed.) VCH, New York. pp. 83–108.
- Bold, H. y Wynne, M. (1985). Introduction to the Algae. Prentice-Hall, New Jersey. 720 pp.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

- Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, M. P. y Saoncella, A. (2001). An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Wat. Res.* 35: 69-76.
- Campbell, W. H. y Kinhorn, J. R. (1990). Functional domains of assimilatory nitrate reductase and nitrite reductase. *Trends Biochem. Sci.* 15: 315-319.
- Casano, L. M., Lascano, H. R. y Trippi, V. S. (1994). Hydroxyl radicals and a thylakoid-bound endopeptidase are involved in light and oxygen induce proteolysis in oat chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 35: 145- 152.
- Celis, R., Cornejo, J., Hermosin, M. C. y Koskinen, W. C. (1997). Sorption-desorption of atrazine and simazine by model soil colloidal components. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61: 436-443.
- Cerejeira, M. J., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valerio, M. J., Silva, A., Ferreira, M. y Silva-Fernandes, A. M. (2003). Pesticides in Portuguese surface and groundwaters. *Water Res.* 37: 1055-1063.
- Chalifour, A., Spear, P. A., Boily, M. H., DeBlois, C., Giroux, I., Dassylva, N. y Juneau, P. (2009). Assessment of toxic effects of pesticide extracts on different green algal species by using chlorophyll a fluorescence. *Toxicol. Environ. Chem.* 91: 1315-1329.
- Chevre, N., Brazzale, A. R., Becker-van Slooten, K., Behra, R., Tarradellas, J. y Guettinger, H. (2005). Modeling the concentration response function of the herbicide dinoseb on *Daphnia magna* (survival time, reproduction) and *Pseudokirchneriella subcapitata* (growth rate). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62: 17-25.
- Cid, A., Herrero, C., Torres, E. y Abalde, J. (1995). Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquat. Toxicol.* 31: 165-174.
- Collard, J. M. y Matagne, R. F. (1990). Isolation and genetic analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* strains resistant to cadmium. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2051-2055.

- Couderchet, M. y Vernet, G. (2003). Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55: 271-277.
- Davies, K. J. A. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biochem. Chem.* 262: 9895-9901.
- Debenest, T., Gagne, F., Petit, A. N., Kohli, M., Eullafroy, P. y Blaise, C. (2010). Monitoring of a flame retardant (tetrabromobisphenol A) toxicity on different microalgae assessed by flow cytometry. *J. Environ. Monit.* 12: 1918–1923.
- Diner, B. A. y Petrouleas, V. (1987). Light-induced oxidation of the acceptor-side Fe (II) of photosystem II by exogenous quinones acting through the Q<sub>B</sub> binding site. II. Blockage by inhibitors and their effects on the Fe (III) EPR spectra. *Biochim. Biophys. Acta* 893: 138-148.
- Eppley, R. W. (1978). Nitrate reductase in marine phytoplankton. En: *Handbook of Phycological Methods*. Hellebust, J. A. y Craigie, J. S. (eds.) Cambridge University Press, New York. pp. 217-222.
- Erbes, M., Webler, A., Obst, U. y Wild, A. (1997). Detection of primary DNA damage in *Chlamydomonas reinhardtii* by means of modified microgel electrophoresis. *Environ. Mol. Mutagen.* 30: 448-458.
- Fabregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. y Veiga, M. (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture* 42: 207-215.
- Franklin, N. M., Stauber, J. L., Markich, S. J. y Lim, R. P. (2000). pH dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquat. Toxicol.* 48: 275-289.
- Franqueira, D., Cid A., Torres E., Orosa M. y Herrero C. (1999). A comparison of the relative sensitivity of structural and functional cellular responses in the alga *Chlamydomonas eugametos* exposed to the herbicide paraquat. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36: 264-269.

- Gaynor, J. D., MacTavish, D. C. y Labaj, A. B. (1998). Atrazine and metolachlor residues in brookston Cl following conventional and conservation tillage culture. *Chemosphere* 36: 3199-3210.
- Geoffroy, L., Gilbin, R., Simon, O., Floriani, M., Adam, C., Pradines, C., Cournac, L. y Garnier-Laplace, J. (2007). Effect of selenate on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 83: 149-158.
- Gish, T. G., Shirmohammadi, A. y Wienhold, B. J. (1994). Field-scale mobility and persistence of commercial and starch-encapsulated atrazine and alachlor. *J. Environ. Qual.* 23: 355-359.
- Gonzalez-Barreiro, O., Rioboo, C., Cid, A. y Herrero, C. (2004). Atrazine induced chlorosis in *Synechococcus elongates* cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46: 301-307.
- Goodwin, T. W. y Britton, G. (1988). Distribution and analysis of carotenoids. En: *Plant Pigments*. Goodwin, T. W. (ed.). Academic Press, Padstow, Cornwall. pp. 61-132.
- Gorman, D. S. y Levine, R. P. (1965). TAP and Tris-minimal medium recipes. *PNAS* 54: 1665-1669.
- Granum, S., Kirkvold, S. y Mykkestad, S. M. (2002). Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 242: 83-94.
- Harris, E. H., (1998). Introduction to *Chlamydomonas*. En: *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitchondria in Chlamydomonas*. Rochaix, J. D., Goldschmidt-Clermont, M. y Merchant S. (eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 1-11.
- Harris, E. H. (2009). The *Chlamydomonas* Sourcebook. Academic Press, Oxford (UK). 480 pp.

- Hendry, G. A. F. y Price, A. H. (1993). Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. En: *Methods in Comparative Plant Ecology*. Hendry, G. A. F. y Grime, J. P. (eds.) Chapman & Hall, Londres. pp. 148-152.
- Herman, D., Kaushik N. K. y Solomon K. R. (1986). Impact of atrazine on periphyton in freshwater enclosures and some ecological consequences. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 43: 1917–1925.
- Irmer, U., Wachholz, I., Schafer, H. y Lorch, D. W. (1986). Influence of lead on *Chlamydomonas reinhardtii* Danegard (Volvocales, Chlorophyta): accumulation, toxicity and ultrastructural changes. *Environ. Exp. Bot.* 26: 97-105.
- ISO 8692:2012.(2012). Water quality-Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae. *International Organization for Standardization*, Suiza. ISO 8692:2012.
- Jeffrey, S. W. y Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 167: 191-194.
- Johnson, U. G. y Porter, K. R. (1968). Fine structure of cell division in *Chlamydomonas*. Basal bodies and microtubules. *J. Cell. Biol.* 38: 403-425.
- Jones, R. J., Müller, J., Haynes, D. y Schreiber, U. (2003). Effects of herbicides diuron and atrazine on corals of the Great Barrier Reef, Australia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 251: 153–167.
- Kato, Y., Ueno, S. e Imamura, N. (2006). Studies on the nitrogen utilization of endosymbiotic algae isolated from Japanese *Paramecium bursaria*. *Plant Sci.* 170: 481-486.
- Kenis, J. D., Silvente, S. T., Morlans, J. D. y Luna, C. M. (1992). Glycolate-, xanthine- and paraquat-mediated inhibition of nitrate reductase in detached oat leaves. *Plant Cell Physiol.* 33: 315-320.
- Kruglov, Yu. V. y Paromenskaja, L. N. (1970). Detoxication of simazine by microscopic algae. *Microbiology* 39: 139-142.

- Leboulanger, C., Rimet, F., de Lacotte, M. H. y Berard, A. (2001). Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae. *Environ. Int.* 26: 131-135.
- Lichtenthaler, H. K. y Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. En: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Wrolstad, R. E. (ed.). John Wiley & Son, New Jersey. pp. F.4.3.1-F.4.3.8
- Luna, C. M., Casano, L. M. y Trippi, V. S. (1997). Nitrate reductase is inhibited in leaves of *Triticum aestivum* treated with high levels of copper. *Physiol. Plant.* 101: 103-108.
- Ma, J., Xu, L., Wang, S., Zheng, R., Jin, S., Huang, S. y Huang, Y. (2006). Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotox. Environ. Saf.* 51: 128-132.
- Macinnis-Ng, C. M. O. y Ralph, P. J. (2003). Short-term impact and recovery of *Zostera capricorni* photosynthesis after herbicide exposure. *Aquat. Bot.* 76: 1-15.
- Meakins, N. C., Bubb, J. M. y Lester, J. N. (1995). The mobility, partitioning and degradation of atrazine and simazine in the salt marsh environment. *Marine Poll. Bull.* 30: 812-819.
- Moreland, D. E. (1980). Mechanisms of action of herbicides. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 597-638.
- Nalewajko, C. y Olaveson, M. M. (1995). Differential responses of growth, photosynthesis, respiration and phosphate uptake to copper in copper tolerant and copper-intolerant strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Can. J. Bot.* 73: 1295-1303.
- Nickelsen, J. y Kück, U. (2000). The unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* as an experimental system to study chloroplast RNA metabolism. *Naturwiss.* 87: 97-107.
- Oettmeier, W., Masson, K., Fedtke, C., Konze, J. y Schmidt, R. R. (1992). Effect of different photosystem II inhibitors on chloroplasts isolated from species either

- susceptible or resistant toward *s*-triazine herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 18: 357-367.
- Parsons, T. R. y Strickland, J. D. H. (1965). Particulate organic matter. III.I. Pigment analysis. III.II. Determination of phytoplankton pigments. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 18: 117-127.
- Perales-Vela, H., Gonzáles-Moreno, S., Montes-Horcasitas, C. y Cañizares Villanueva, R. O. (2007). Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (*Chlorophyceae*). *Chemosphere* 67: 2274-2281.
- Prado, R. (2010). Citotoxicidad ejercida por el herbicida bupiridílico paraquat sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas moewusii* Gerloff. Tesis Doctoral. Universidad de A Coruña. 294 pp.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A. (2009). The herbicide paraquat induces alterations in the elemental and biochemical composition of non-target microalgal species. *Chemosphere* 76: 1440-1444.
- Raven, J. A. y Geider, R. J. (1988). Temperature and algal growth. *New Phytol.* 110: 441-461.
- Rioboo, C., Gonzalez, O., Herrero, C. y Cid, A. (2002). Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. *Aquat. Toxicol.* 59: 225-235.
- Rioboo, C. (2008). Toxicidad ejercida por un herbicida de tipo triazina sobre la microalga dulceacuícola *Chlorella vulgaris* Beijerinck: alteraciones fisiológicas y estructurales. Tesis Doctoral. Universidad de A Coruña. 359 pp.
- Saladin, G., Magne, C. y Clement, C. (2003). Impact of flumioxazin herbicide on growth and carbohydrate physiology in *Vitis vinifera*. L. *Plant Cell Rep.* 21: 821-827.
- Snell, F. D. y Snell, C. T. (1949). Colorimetric methods of analysis. Vol. 2, 3ªed. Van Nostrand, New York. 804pp.

- Sobrinho, C., Montero, O. y Lubian, L. M. (2004). UV-B radiation increases cell permeability and damages nitrogen incorporation mechanism in *Nannochloropsis gaditana*. *Aquat. Sci.* 66: 421-429.
- Soldo, D., Hari, R., Sigg, L. y Behra, R. (2005). Tolerance of *Oocystis nephrocytioides* to copper: intracellular distribution and extracellular complexation of copper. *Aquat. Toxicol.* 71: 307-317.
- Solomon, K. R., Baker, D. B., Richards, R. P., Dixon, K. R., Klaine, S. J., La Point, T. W. y Williams, W. M. (1996). Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 31-76.
- Southwick, L. M., Willis, G. H., Johnson, D. C. y Selim, H. M. (1995). Leaching of nitrate, atrazine, and metribuzin from sugarcane in southern Louisiana. *J. Environ. Qual.* 24: 684-690.
- Starr, J. L. y Golfelty, D. E. (1990). Atrazine and bromide movement through a silt loam soil. *J. Environ. Qual.* 19: 552-558.
- Strickland, J. D. H. y Parsons, T. R. (1972). A Practical Handbook of Seawater Analysis. 2º ed., Fisheries Research Board of Canada, Ottawa. 310 pp.
- Thaivanich, S. e Incharoensakdi, A. (2007). Purification and characterization of nitrate reductase from halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 85-92.
- Tripathi, B. N. I. y Gaur, J. P. (2006). Physiological behavior of *Scenedesmus sp.* during exposure to elevated levels of Cu and Zn and after withdrawal of metal stress. *Protoplasma* 229: 1-9.
- Tukaj, Z., Matusiak-mikulin, K., Lewandowska, J. y Szurkowski, J. (2003). Changes in the pigment patterns and the photosynthetic activity during a light-induced cell cycle of the green alga *Scenedesmus armatus*. *Plant Physiol. Bioch.* 41: 337-344.
- Ünyayar, S., Keles, Y. y Cekic, F. Ö. (2005). The antioxidative response of two tomato species with different drought tolerances as a result of drought and cadmium stress combinations. *Plant Soil Environ.* 51: 57-64.

- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M. y Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64: 178-189.
- Van der Heever, J. A. y Grobbelaar, J. U. (1998). *In vivo* chlorophyll *a* fluorescence of *Selenastrum capricornutum* as a screening bioassay in toxicity studies. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35: 281-286.
- VanWezel, A. P. y van Vlaardingen, P. (2004). Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquat. Toxicol.* 66: 427-444.
- Velasco, P. J., Tischner, R., Huffaker, R. C. y Whitaker, J. R. (1989). Synthesis and degradation of nitrate reductase during the cell cycle of *Chlorella sorokiniana*. *Plant Physiol.* 89: 220-224.
- Wehr, J. D. (2011). Freshwater Algae: Identification and use as bioindicators. *J. Phycol.* 47: 436-438.
- Wong, P. K. (2000). Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll *a* synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere* 41: 177-182.