



---

***Extrema resistencia a dosis agudas de radiaciones ionizantes en diferentes líneas de microalgas.***

***¿La adaptación a un medioambiente rico en uranio confiere radioprotección?***

---



**VANESSA POMBO BARROS**

23 de Junio 2014

***Directores:***

***Eduardo Costas Costas***

***Ana González Tizón***



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



MASTER EN BIOLOGIA MOLECULAR CELULAR Y GENETICA

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	2
1-Microalgas. Fila y características.....	2
2-Radiobiología. Consideraciones generales.....	4
3-G. <i>Chlorella</i> , un ejemplo de supervivencia frente a la radiación.....	7
4-Las microalgas radioresistentes de Saelices y Villavieja.....	8
OBJETIVOS.....	9
MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
Primera Fase.....	10
Segunda Fase.....	13
RESULTADOS.....	14
Primera Fase.....	14
Segunda Fase.....	19
DISCUSIÓN.....	28
Primera Fase.....	28
Segunda Fase.....	30
CONSIDERACIONES FINALES.....	37
CONCLUSIONES.....	38
FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....	38
AGRADECIMIENTOS.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40
GLOSARIO.....	44
ADENDA.....	45

## INTRODUCCIÓN

### 1-Microalgas. Fila y características.

Las microalgas son microorganismos uni o pluricelulares fotosintéticos eucariotas que pueden crecer de manera autotrófica o heterotrófica. Las primeras especies aparecieron en el planeta hace 2500 millones de años (m.a). Se consideran las primeras formas de vida en nuestro planeta. Son responsables de la fijación de cantidades masivas de dióxido de carbono, producción y mantenimiento del oxígeno de la atmósfera, lo que ha permitido el florecimiento evolutivo de todas las formas de vida superiores.

Dado que el 72% de la tierra está cubierta por océano, el fitoplancton representa el grupo más importante de productores primarios, formado por un conjunto heterogéneo de crisófitas, pirrófitas, cianofitas (algas verde-azules), clorofitas (algas verdes) y euglenófitas.

El nanofitoplancton (formas menores de 20  $\mu\text{m}$ ) está formado, entre otros, por cocolitofóridos (crisófitas) y dinoflagelados (pirrófitas) con tasas de reproducción de dos a tres veces mayores que las del fitoplancton de mayor tamaño.

Puesto que en el presente trabajo se relaciona directamente el crecimiento celular con la radioresistencia, se describe someramente las principales características biológicas de las especies a estudio en base a los criterios de Clinton (1986), Margulis *et al.* (1985) y Scagel *et al.* (1991). A pesar de que se describen los ciclos vitales completos, recordemos que todos los cultivos están en fase haploide, pues proceden de un clon.

#### **-G. *Microcystis*.**

División Cyanobacteria. Clase Cyanophyceae (alga verde-azulada). Orden Chroococcales.

Esféricas, unicelulares (o coloniales irregulares) fotoautótrofas y se reproducen por fisión binaria. Fijan grandes cantidades de nitrógeno, gracias a la actividad nitrogenasa. No presentan flagelos y su movimiento es deslizante. Produce toxinas y suele causar la muerte del ganado o de pájaros que beben el agua que la contiene. Viven en ambientes marinos y de agua dulce.

Durante el eón Proterozoico (2500 m.a-600 m.a) vivieron su época dorada, aunque los fósiles más antiguos se remontan al Precámbrico (3000 m.a). Los restos de sus comunidades del pasado son los llamados estromatolitos.

#### **-G. *Chlamydomonas*, *Dictyosphaerium* y *Tetraselmis*.**

División Chlorophytas.

Constituyen uno de los principales componentes del fitoplancton. La parte más aparente de la célula es el cloroplasto, presentan un único núcleo y la pared celular es de celulosa y pectina. Fijan más de mil millones de toneladas de carbono al año en los océanos y masas de agua continental. En general viven en lagos y ríos de las regiones templadas. Su historia fósil se remonta al Precámbrico, aunque el registro es pobre.

**G. *Chlamydomonas*:** Clase Chlorophyceae, Orden Volvocales.

Es un alga unicelular colonial nadadora con dos flagelos. Vive tanto en marismas como en pozas de agua dulce. La división celular comprende un huso cerrado y la membrana nuclear permanece intacta. El ciclo de vida (predominantemente haploide) comienza con la fusión de los isogametos (singamia) flagelados y haploides, positivo y negativo, para generar un planozigoto (diploide) aflagelado que va adquiriendo una forma redondeada a la vez que segrega una dura pared celulósica. El cigoto resultante (forma de reposo con gran capacidad para soportar condiciones extremas) sufre sucesivas meiosis (germinación del cigoto) hasta obtener como mínimo 4 meiósporas móviles positivas y

negativas (en un principio no presentan flagelos). Éstas son liberadas y crecen hasta obtener el tamaño de una célula vegetativa ya con los dos flagelos y el ciclo continúa.

**G. Dictyosphaerium:** Clase Chlorophyceae. Orden Chlorococcales.

Produce esporas no móviles o aplanósporas. Vive en hábitats de marismas y agua dulce.

**G. Tetraselmis:** Clase Prasinophyceae. Orden Volvocales.

Marina, unicelular, verde, oval y con 4 flagelos isodinámicos en posición anterior (situada en la misma dirección de avance). Se reproducen por división binaria, perdiendo así el estado móvil, y dando dos células hijas completamente flageladas antes de la liberación de la teca. Muy empleada en acuicultura por su riqueza en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

### **-G. Nitzschia y Emiliana.**

División Chrysophyta.

**G. Nitzschia:** Clase Bacillariophyceae (diatomeas).

Orden Pennales.

Son uninucleadas, unicelulares (**Figura 1**) y fotosintetizadoras obligadas. Presentan una frústula (pared celular) con dos tecas (epiteca e hipoteca), llamadas valvas, compuestas por material orgánico péctico impregnado de SiO<sub>2</sub> hidratado en estado opalino. Las diatomeas necesitan sílice disuelto para su crecimiento y lo extraen del agua con mucha



Figura 1: *N. closterium*.  
Fuente: www.Flickr.com

eficacia. Se encuentran distribuidas en las zonas iluminadas de los ecosistemas acuáticos de todo el mundo. Son un importante grupo en la base de las cadenas tróficas.

Es una diatomea pennada, por lo que presenta simetría bilateral con forma acicular.

Pasa la mayoría de su ciclo vital en estado diploide y la meiosis tiene lugar justo antes de la formación de gametos haploides. La reproducción asexual es por división celular vegetativa. Poseen un huso irregular y altamente organizado y la membrana nuclear se rompe durante la mitosis. Las frústulas de menos tamaño se vuelven sexualmente activas produciendo gametos después de la meiosis. El *G. Nitzschia* produce más de cuatro gametos amiboideos por célula.

Las diatomeas son el grupo más importante del medio marino, pues proporcionan el 20-25% de la productividad primaria neta. Los depósitos fósiles se remontan hasta el período Cretácico. Son cosmopolitas, se encuentran en el plancton, como epífitas o como comunidades bentónicas sobre rocas, arena o superficies fangosas.

**G. Emiliana:** Clase prymnesiophyceae. Orden Isochrysidales.

Alga cocolitoforal del Atlántico (**Figura 2**) Unicelulares, de color dorado y planctónicas. Presentan un haptonema, escamas y cocolitos. Tras el paso de estadio de vida libre a vida fija (estadio cocolitoforal), se desarrollan una serie de escamas (fase escamosa y desnuda) y cocolitos en el interior celular. Su proceso de formación consiste en la precipitación de cristales de carbonato cálcico sobre unas placas de polímeros orgánicos, las cuales se formaron en el aparato de Golgi. Los cocolitos formados se transportan hasta la periferia de la célula por microtúbulos y se depositan en la superficie celular.

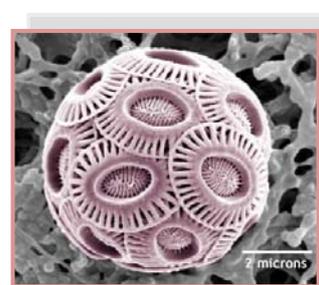


Figura 2: *E. huxleyi* al microscopio electrónico de barrido. Por el Dr. Markus Geisen, fotógrafo del museo Natural de Historia de Londres. (earthguide.ucsd.edu).

Durante unos 100 m.a (desde el Cretácico), han generado grandes cantidades de carbonato cálcico

particulado, contribuyendo así a la formación de los depósitos carbonatados de los fondos marinos.

La reproducción es básicamente vegetativa, por división longitudinal de la célula resultando en dos o cuatro células hijas. El recuento de los cromosomas en esta clase indica que durante la fase móvil estos organismos son diploides, pero esta fase alterna con otra no móvil (fija) haploide. La meiosis debe ocurrir durante la producción de las formas nadadoras. La existencia de varias formas en el ciclo vital indica la posibilidad de que exista reproducción sexual.

Domina las aguas cálidas tropicales y subtropicales marinas. Se encuentran en el registro fósil desde el Jurásico inferior del período Mesozoico.

### **-G. *Prorocentrum*.**

División Dinophyta. Clase Dinophyceae. Orden Prorocentrales.

Dinoflagelado unicelular, móvil de vida libre. La pared celular celulósica o teca consta de dos mitades comprimidas lateralmente. Posee dos flagelos apicales. El núcleo es grande y encierra cromosomas condensados que carecen de histonas durante todo el ciclo. En la mitosis, la membrana nuclear y el núcleo permanecen intactos (mitosis cerradas). Los microtúbulos se extienden a través de canales citoplasmáticos hasta el núcleo, uniéndose a la membrana nuclear adyacente a los sitios de unión del cromosoma, separándose los nuevos núcleos durante la división, pero no los cromosomas, los cuales están fijos en la membrana nuclear. El ciclo de vida sexual es haplocóntico y la meiosis ocurre durante o después de la germinación del cigoto. La reproducción asexual es por división celular y la teca se divide a la mitad o se forma una nueva después de la muda de la pared vieja (por escisión).

Son productores primarios importantes y los florecimientos de dinoflagelados en el océano se llaman “mareas rojas”.

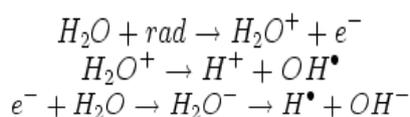
Los dinoflagelados datan desde el período Silúrico (440 m.a), pero la mayor diversidad de especies ocurre en el Cretácico.

## **2-Radiobiología. Consideraciones generales.**

La **radiobiología** nace con los estudios de Bergonie y Tribondeau (1906) que elaboran una importante ley que relaciona la sensibilidad de una célula a las radiaciones ionizantes con su actividad mitótica, grado de diferenciación y probabilidad de futuras divisiones. Diecinueve años después se añaden dos nuevos conceptos: el estrés biológico celular y las condiciones en la que ésta se encuentra antes y después de la radiación. Ambas teorías fundamentaron la radiobiología, considerando como tal la serie de sucesos que se producen en un tejido vivo o células aisladas tras la absorción de energía procedente de radiaciones ionizantes y los esfuerzos de éstos por compensar los efectos de esta absorción y las lesiones producidas.

Según Latorre (1979) debemos considerar que: La interacción de la radiación con las células es una cuestión de azar, es decir, puede interaccionar o no con la célula y si sucede lo primero pueden producirse o no daños. Además, la cesión inicial de energía ocurre muy rápidamente, en fracciones de millonésimas de segundo ( $10^{-17}$ seg.). Por otra parte, la interacción de la radiación con una célula dada es no selectiva, es decir, la energía interactúa de forma aleatoria sin elegir ninguna zona concreta de la célula. Así mismo, si bien las lesiones radioinducidas a nivel molecular son inmediatas, los efectos biológicos suelen observarse tras un cierto período de tiempo (período de latencia), que dependerá de la dosis absorbida y de la cinética celular.

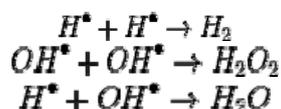
La ionización y excitación postirradiación suponen un incremento de energía para las moléculas afectadas, comprometiendo su estabilidad. Dichos efectos dependen del tiempo. **Etapa Física:** respuesta inmediata que ocurre entre billonésimas y millonésimas de segundo. En ella interaccionan los electrones corticales con los fotones o partículas que constituyen el haz de radiación. Los electrones secundarios originados en la interacción, excitan e ionizan a otros átomos provocando una cascada de ionizaciones (100000 ionizaciones/Gray (Gy) en un volumen de 10 micras cúbicas). En este proceso pueden verse afectados directamente los componentes del DNA y otras moléculas vitales. En la etapa posterior o **Etapa química**, que dura entre una millonésima de segundo y un segundo, la hidrólisis del agua deja un ion  $H_2O^+$  y un electrón libres. El ion  $H_2O^+$  es muy inestable y rápidamente se descompone en un protón ( $H^+$ ) y un radical  $OH\cdot$ . El electrón libre, puede reaccionar con otras moléculas orgánicas o con una segunda molécula de agua produciendo radicales  $H\cdot$  e iones hidroxilo  $OH^-$ . Los iones hidroxilo y los protones libres al ser partículas con cargas opuestas no suponen un peligro pues tenderán a atraerse y neutralizarse para formar de nuevo agua. Sin embargo, los radicales  $H\cdot$  y  $OH\cdot$  son moléculas neutras con gran reactividad química pues tienen un electrón desaparejado que con muy poco esfuerzo tenderá a crear enlaces y robar así átomos a otras moléculas que, en el peor de los casos, pueden ser biomoléculas funcionales tales como proteínas o nucleótidos [rad=radiación].



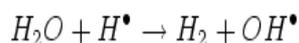
Puede ocurrir también que se formen los radicales libres a partir de la radiación de una molécula de agua. No se conocen bien los fenómenos que se producen, pero teóricamente es posible la disociación de esta en radicales  $H\cdot$  y  $OH\cdot$ . De una manera u otra se forman radicales que no poseen electrones apareados, lo que los hace altamente reactivos, bien como agentes oxidantes o reductores (Dutreix *et al.*, 1980).



Los radicales se distribuyen de forma heterogénea a lo largo de la trayectoria de radiación y una parte de ellos se pierden en reacciones neutralizadoras combinándose de la siguiente forma.



Otros se propagan pudiendo afectar a las cadenas de DNA si éstos han sido generados en el núcleo celular.



Un parámetro a tener en cuenta es la dosis letal media (DO) o cantidad de radiación que genera una lesión letal por célula destruyendo al 63% de éstas (por ejemplo, en células epiteliales humanas bien oxigenadas es de aproximadamente 3 Gy) (Mori *et al.*, 2004). El número de lesiones que se detectan en el DNA inmediatamente después de irradiar a una dosis DO ha sido estimado en (**Tabla 1**):

- Daño de bases > 1000.
- Roturas simples de cadena, alrededor de 1000.
- Roturas dobles de cadena, alrededor de 40.

Si examinamos las lesiones generadas directa o indirectamente en el DNA, encontraremos (Tabla 2):

a) Roturas de una cadena, las más frecuentes, se dan en el enlace fosfodiéster, o entre la base nitrogenada y la pentosa (de 500 a 1000 roturas por Gy). Suelen repararse si su cantidad por núcleo no es muy elevada.

b) Rotura de doble cadena: Es una lesión compleja por rotura de las dos hebras del DNA en sitios muy próximos tras la interacción única o por combinación de dos roturas simples de cadenas complementarias. Cada Gy de radiación ocasiona unas 40 roturas dobles de cadena por célula pero este número varía mucho en función del nivel de oxigenación intracelular. Esta lesión frecuentemente conduce a la muerte celular.

c) Pérdida de una o más bases nitrogenadas o modificación química de alguna de ellas o la formación de dímeros entre dos bases contiguas. La radiosensibilidad en orden decreciente es: Timina>Citosina>Adenina>Guanina. Su frecuencia por Gy es entre 800 y 1000. Son lesiones, como los dímeros de Timina, susceptibles de reparación, aunque si no se produce correctamente puede provocar el desarrollo de una mutación puntual.

d) En tramos de DNA en fase de replicación o transcripción se pueden dar entrecruzamientos entre el DNA y las proteínas: Se da unas 150 veces por Gy. Pero lo más frecuente es que en cada núcleo irradiado las lesiones sean múltiples y de los diversos tipos antes indicados.

Un punto fundamental lo constituye el modo en que los diversos tipos de radiación electromagnética ceden su energía a la materia viva en relación a la densidad de ionización que se va produciendo a lo largo de su recorrido, o “transferencia lineal de energía” o LET (Cunningham, 1977). Se expresa en Kev por micra y representa la energía transferida por unidad de longitud recorrida. En este sentido, a igual dosis absorbida, la eficacia biológica de las radiaciones de alto LET (partículas cargadas pesadas y neutrones) es sensiblemente mayor (mayor ionización) que las de bajo LET (menor ionización) como las electromagnéticas y las corpusculares ligeras (neutrones) (Barendsen y Broerse, 1970).

Existen diferentes **mecanismos para la reparación** (Barreno, 2009) de las lesiones radioinducidas en el DNA como son:

Agent	DNA lesion	Number of lesions per cell per D <sub>37</sub> <sup>b</sup>	Reference
Ionizing radiation	ssB	1000	17
	dsB	40	17
	Total LMDS <sup>c</sup>	440	68
	DPC <sup>d</sup>	150	20
Bleomycin A2	ssB	150	69, 70
	dsB	30	
UV light	T<>T dimer	400,000	71-73
	ssB	100	
Hydrogen peroxide	ssB	<2,600,000	64
	?		
Benzo(a)pyrene 4,5-oxide	Adduct	100,000	74
Aflatoxin	Adduct	10,000	75
1-Nitropyrene	Adduct	400,000	76
Methylnitrosourea	7-Methylguanine	800,000 <sup>e</sup>	77
	O <sup>6</sup> -Methylguanine	130,000 <sup>e</sup>	
	3-Methyladenine	30,000 <sup>e</sup>	
2-(N-Acetoxy-N-acetyl)amino-fluorene	Adduct	700,000	74
Other similar aromatic amides produce about the same number of adducts per lethal event			

Tabla 1: Daños en el DNA necesarios para matar al 63% de las células expuestas. Datos obtenidos de: Ward *et al.* (1988). D<sub>37</sub>=Dosis que el agente requiere para reducir la supervivencia de las células al 37%. LMDS=Localizados múltiples lugares de daño.

MEASURED NUMBERS OF DAMAGED SITES PER CELL PER GRAY	
Type	Yield
Single-strand breaks	1000
8-Hydroxyadenine	700
T* (thymine damage)	250
Double-strand breaks	40
DNA-protein cross-links	150

Tabla 2: Efectos de la radiación sobre el DNA. Datos obtenidos del MIT: [ocw.mit.edu/radiation/ef of rad on dna.pdf](http://ocw.mit.edu/radiation/ef_of_rad_on_dna.pdf).22.55.

- *Reparación de bases dañadas*: Se reparan roturas del enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos o daños por alquilación o por metilación. En la reparación de roturas interviene la DNA ligasa. Las alquiltransferasas reparan los daños por alquilación, transfiriendo el grupo alquilo, normalmente metilo, del DNA a su propia cadena polipeptídica.

- *Escisión de bases*: Una glicosidasa reconoce la base nitrogenada alterada y la elimina, una endonucleasa reconoce el hueco producido y con ayuda de una fosfodiesterasa corta el enlace fosfodiéster. Posteriormente, la DNA polimerasa añade el nucleótido que falta y la DNA ligasa sella la rotura de la hélice.

- *Escisión de nucleótidos*: Se pone en marcha cuando la lesión radioinducida origina dímeros de pirimidina (T-T, C-T y C-C) o uniones intracadena. Este tipo de daño suele producirse por agentes químicos o por radiación ultravioleta. En este proceso de reparación intervienen endonucleasas que cortan de 24 a 29 nucleótidos alrededor del daño o de los nucleótidos mutados. Previamente se abre la doble cadena. Ocurre normalmente acoplado a la transcripción, donde uno de los factores de transcripción, con actividad helicasa, es el encargado de separar las dos cadenas. Después actúa una DNA polimerasa y una DNA ligasa.

a- Reparación de roturas simples de cadena: Utiliza el mecanismo de escisión de bases. Es un proceso rápido, ya que el 50% de las mismas se reparan en aproximadamente 15 minutos. Uno de los genes implicados en este tipo de reparación es el que codifica la enzima nuclear (PARP-1) que reconoce las roturas simples de cadena.

b- Reparación de roturas dobles de cadena: Entre las causas de estas roturas están las radiaciones ionizantes y algunos mutágenos químicos. Las cadenas con rotura doble son reagrupadas en 4-6 horas por la gran complejidad del proceso, que casi siempre provoca errores que conducen a la muerte celular (excepto en células tumorales). Existen dos mecanismos para llevar a cabo este tipo de reparación: por recombinación de cromosomas homólogos y reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ: Non-Homologous End Joining).

Por último, es interesante señalar que las lesiones producidas a nivel nuclear se reflejan en fenómenos morfológicos posteriores como la vacuolización, pincosis (el núcleo se contrae y densifica), cariorrexis (rotura nuclear en fragmentos), cariólisis y en aberraciones cromosómicas como roturas de las cromátidas, formación de puentes anafásicos, fragmentos acéntricos y repartos cromosómicos desequilibrados en la anafase. Estas lesiones morfológicas conllevan alteraciones funcionales que de ser irreversibles conducen al retraso mitótico, a una incapacidad de división o bien a la muerte celular.

### **3- *G. Chlorella*, un ejemplo de supervivencia frente a la radiación.**

Hace ya algunas décadas que se ha descubierto y estudiado la extraordinaria capacidad del *G. Chlorella* para sobrevivir a las radiaciones tanto en exposiciones crónicas como agudas. Así, Posner (1965) encontró para el caso de irradiación crónica con un flujo de 72 Gy/día, que debía esperarse hasta 72 horas (216 Gy acumulados) para identificar una reducción del 50% en el crecimiento. En cuanto a su respuesta a irradiación aguda, Posner (1965), encontró un DL90 de 230 Gy a los diez días tras la irradiación. Igualmente con irradiación aguda, Gannutz (1972) encontró una reducción en el crecimiento del 50% para dosis de 240 Gy. En un minucioso estudio llevado a cabo por Martínez y Fernández (1983), irradiando *Chlorella pyrenoidosa* a dosis entre 10 y 5000 Gy, se observó una reducción en el crecimiento del 50% a las 96 horas postirradiación a

una dosis comprendida entre los 100 y los 500 Gy. Una variante realizada por Kunz (1972) consistió en exponer a *Chlorella sorokiniana* a dos dosis fraccionadas de 100 Gy. Tras la segunda irradiación, la curva de supervivencia mostró un hombro típico que indica la capacidad de recuperación del daño subletal sufrido tras la primera irradiación, lo que demuestra la enorme capacidad de este organismo para reparar lesiones producidas por irradiación. Hay que tener en cuenta que estas dosis de radiación son enormemente superiores a las soportadas por células de eucariotas superiores.

En un estudio comparativo entre radiosensibilidades en función del flujo de irradiación, se observa que el *G. Chlorella* es mucho más sensible a una exposición crónica que a una aguda para la misma dosis de irradiación gamma (Posner, 1965). En este sentido, Posner y Sparrow (1964) comparando la radiosensibilidad de los *G. Chlorella* y *Chlamydomonas* encontraron un DL90 (dosis letal al 90 %) muy superior para *Chlorella* que para *Chlamydomonas* cuando se les administraban irradiaciones agudas. Esta diferencia en la radiosensibilidad de ambos organismos concuerda con lo esperado por su contenido en DNA. Sin embargo, cuando la irradiación se administraba de una forma continua, el *G. Chlorella* se hacía más radiosensible que el *G. Chlamydomonas*.

Ya en 1979 Horikoshi *et al.* estudiaron la capacidad del *G. Chlorella* para captar metales radiactivos, concretamente uranio. Pudieron identificar y cuantificar dicha propiedad investigando los componentes celulares responsables. Cuando analizaron la masa seca encontraron que la fracción celulósica de la pared solo mostraba un 34% del contenido en uranio del total almacenado, cantidad que ascendía al 85% en un posterior estudio en células vivas.

Para establecer un criterio comparativo entre la respuesta a la radiación gamma entre el *G. Chlorella* y eucariotas superiores, hay que considerar que los primeros efectos tras dosis agudas comienzan en el *G. Chlorella* a partir de 100 Gy y que, sin embargo, la Dosis Letal Media (DO) para células de piel humana es de 3 Gy (Mori *et al.*, 2004).

#### **4-Las microalgas radioresistentes de Saelices y Villavieja.**

Existen en la naturaleza medioambientes extremos que sostienen comunidades de microalgas (denominadas extremófilas) viviendo próximas a sus límites de tolerancia biológica. Ejemplos de ellos son las comunidades que habitan en torno a fumarolas volcánicas submarinas o en el lecho de ríos como en río Tinto (pH 1,7–2,5 y un altísimo contenido en diversos metales a concentraciones mayores de 20 g/L) (Amaral-Zettler *et al.*, 2002).

En los últimos tiempos se están dando cambios antropogénicos que generan nuevos medioambientes extremos radiactivos. Un ejemplo de ello son los residuos acuosos de la minería de uranio en Salamanca, en concreto en Saelices y Villavieja (25 millones de metros cúbicos y una riqueza en torno a 400-800 mg kg/L de Uranio). Los trabajos de extracción, lavado ácido y concentración desarrollados entre los años 1960 y 2000 en esta mina, han resultado en aguas residuales que se situaron en pozas escavadas en la roca. Estas aguas contienen altos niveles de radiación y bajo pH (niveles de uranio superior a 200 mg/kg, radiactividad de 4 Micro Sv/h, y pH de 3,38). El uranio se considera un polucionante peligroso: por su capacidad radiactiva, por su toxicidad como metal pesado (Markich, 2002), por disolverse en el agua y porque su vida media es de aproximadamente 4,5 millones de años (Kalin *et al.*, 2005).

Sorprendentemente, se observó una abundante biomasa de microalgas creciendo en esas condiciones tan extremas, de entre las cuales destacamos *Chlamydomonas fonticola* (2200 células ml/L) y *Dictyosphaerium ehrenbergianum* (800 células ml/L). En particular, el *G. Chlamydomonas* representaba el 90% de la biomasa fitoplanctónica

total (García-Balboa *et al.*, 2013) y además se descubrió que tenía la capacidad de bioadsorber uranio (32 mg uranio/g peso seco) en su pared y bioacumularlo en el interior del citoplasma. Estos hechos son más notables si tenemos en cuenta que *Chlamydomonas fonticola* y *Dictyosphaerium ehrenbergianum* se han adaptado a estas condiciones en tan solo 52 años. Diversos experimentos han demostrado que no se pudo dar la aclimatación fisiológica habitual, sino una adaptación genética muy rápida mediante mutaciones espontáneas (en un número muy bajo) previas a la exposición al uranio. Posiblemente, estas mutaciones ocurrieron por recombinación durante el apareamiento sexual, ya que la adaptación lograda por ambas especies ha debido requerir más de una mutación (García-Balboa *et al.*, 2013).

## OBJETIVOS

**En este estudio pretendemos:**

### **A) En una primera Fase.**

1-Identificar la respuesta a una exposición aguda de radiación gamma (en dosis de 50, 100, 250, 500 y 1000 Gy) de seis especies de microalgas (*Dictyosphaerium chlorelloides*, *Microcystis aeruginosa*, *Prorocentrum lima*, *Nitzschia closterium*, *Emiliania huxleyi* y *Tetraselmis suecica*) filogenéticamente diferentes, valorando el efecto de esta radiación ionizante sobre el crecimiento celular de dichos microorganismos.

2-Determinar los límites de dosis y tiempos postexposición a partir de los cuales los cambios inducidos en la cinética, morfología y movilidad celular se hacen significativos.

3-Ver si existen o no diferencias en radiosensibilidad entre las microalgas de agua dulce y salada.

4-Así mismo, estudiar el efecto de las dosis bajas a fin de detectar fenómenos de radioestimulación.

### **B) En una segunda Fase.**

Una vez bien establecido el protocolo de trabajo y las dosis de radiación en el experimento anterior, mediremos el comportamiento celular de *Chlamydomonas fonticola* y *Dictyosphaerium ehrenbergianum* (líneas adaptadas a un ambiente radioactivo, mina de uranio de Saelices), comparándolo con los halotipos más parecidos existentes en colección (*Chlamydomonas reinhardtii* y *Dictyosphaerium chlorelloides*).

5-Comprobaremos si los mecanismos de adaptación (a 52 años de exposición crónica a dosis elevadas de uranio) las han dotado de una capacidad aún mayor de sobrevivir a niveles muy elevados de radiaciones ionizantes. Este dato podría aportar un mayor conocimiento sobre la capacidad de estos microorganismos a adaptarse a futuros agravamientos de las condiciones de los ambientes extremófilos actuales como consecuencia del cambio climático progresivo.

6-Comparar y cuantificar las posibles diferencias en la respuesta a la radiación gamma de las líneas de Saelices *versus* colección.

7-Así mismo, buscaremos conocer cuál o cuáles de estas dos microalgas a estudio es más radioresistente y a qué dosis de radiación.

8-Analizar si existe respuesta radioestimulante frente a dosis bajas de radiación gamma en estas microalgas bioacumuladoras de uranio.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### »Estandarización de los resultados.

Dado que el conteo de microalgas puede dar lugar a una serie de errores experimentales elevados, nuestro primer paso consistió en realizar una estandarización de la calidad de nuestros recuentos siguiendo las recomendaciones del Instituto Británico de Estandarización (Standard Institute, BSI). Así, calculamos nuestra repetibilidad (comparación del error producido por dos observadores diferentes en el conteo de la misma muestra y en el mismo laboratorio) y nuestra reproducibilidad (error cometido por dos laboratorios diferentes sobre la misma muestra). En todos los casos la repetibilidad y la reproducibilidad tuvieron un error estándar por debajo del 5%.

### ◆ Primera Fase.

#### 1-Especies empleadas.

Las seis microalgas seleccionadas (**Tabla 3**) para esta primera fase del estudio proceden de la colección del Departamento de Genética-Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. En la siguiente tabla especificamos su hábitat, tasa de crecimiento y código de colección.

Especies empleadas	Hábitat	Tasa de crecimiento	Código de colección
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Agua continental, Pantano Melonares, Cuenca.	1,10	DC1M
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Agua continental, Doñana.	1,21	MaD12
<i>Prorocentrum lima</i>	Agua costera, adquirido de SAG Algae.	0,6	ProL1
<i>Nitzschia closterium</i>	Agua costera, Cádiz.	0,93	NC1C
<i>Emiliania huxleyi</i>	Oceánica, adquirido de SAG Algae.	0,81	Eh372
<i>Tetraselmis suecica</i>	Agua costera, Cerdeña.	1,1	Ts1Ce

Tabla 3: Especies empleadas en la primera Fase.

#### 2-Medios de cultivo.

Para las microalgas de agua dulce se empleó medio BG-11 (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany) diluido al 2% en agua destilada (20 ml de BG11 y 980 ml de agua destilada estéril). El medio utilizado para las algas marinas fue F2 (Sigma) al 2% en agua de mar estéril (ver composiciones en Adenda).



Figura 3. Caja de metacrilato y posición de los frascos Greiner durante la irradiación.

**3-Condiciones de crecimiento.** Las microalgas se cultivaron a 25°C en frascos Greiner de 25 ml (Bio-One Inc., Longwood, NJ, USA) conteniendo 15 ml de medio y bajo luz constante de 60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  y una longitud de onda de 400-700 nm. La primera incubación se realizó durante 6-7 días lográndose un crecimiento exponencial hasta obtener una densidad de cultivo adecuada para poder proceder así a su posterior subcultivo (en seis frascos, uno por especie). Todas las manipulaciones se

realizaron en cámara de flujo laminar vertical. El seguimiento del crecimiento se llevó a cabo bajo observación con microscopio invertido.

Para evitar solapamientos en las futuras representaciones gráficas del crecimiento postirradiación de cada especie y a cada dosis, se decidió que cada frasco de cultivo de cada una de las especies partiese de una densidad poblacional diferente.

#### 4- Condiciones de irradiación (ver Adenda).

Tras analizarlo con los radiofísicos (Centro Oncológico de Galicia Quiroga y Piñeyro) y en vista de los datos bibliográficos previos, se escogieron las siguientes dosis de irradiación: 50 Gy, 100 Gy, 250 Gy, 500 Gy y 1000 Gy (Tabla 4).

Se construyó expresamente una caja de metacrilato adaptada a los treinta frascos de cultivo a irradiar (los otros seis restantes se mantuvieron como controles) (Fig. 3).

Los frascos se irradiaron en posición vertical con la fuente de  $^{60}\text{Co}$  situada en posición inferior (ver Adenda). La irradiación se realizó de la siguiente manera:

-Se colocó el gantry de la unidad a 180°C y se seleccionó un tamaño de campo nominal de 35 cm x 35 cm.

-Se situó la superficie de la mesa (rejilla de tenis) a una DFS=65 cm (por debajo) y el contenedor de metacrilato encima de la rejilla de tenis de la mesa. Se centró el contenedor en el campo de radiación.

-Se niveló en todos los frascos la cantidad de medio de modo que la profundidad de líquido en cada uno de los frascos fuese uniforme en toda la superficie.



Figura 4: Unidad Theratón 780. Archivo Centro Oncológico de Galicia.

X	tiempo a programar en la consola	tiempo acumulado (min)	Hora aprox. de retirada de los frascos	dosis acumulada (Gy)	% dosis total	Acción después de la irradiación
	20,00	20,00	07/06/99 14:20	30,30	3,0%	
	13,00	33,00	07/06/99 14:34	50,00	5,0%	RETIRADA 6 FRASCOS 50 Gy
	20,00	53,00	07/06/99 14:54	80,30	8,0%	
	13,00	66,00	07/06/99 15:08	100,00	10,0%	RETIRADA 6 FRASCOS 100 Gy
	20,00	86,00	07/06/99 15:28	130,30	13,0%	
	20,00	106,00	07/06/99 15:49	160,61	16,1%	
	20,00	126,00	07/06/99 16:09	180,91	18,1%	
	20,00	146,00	07/06/99 16:30	221,21	22,1%	
	19,00	165,00	07/06/99 16:49	250,00	25,0%	RETIRADA 6 FRASCOS 250 Gy
	20,00	185,00	07/06/99 17:10	280,30	28,0%	
	20,00	205,00	07/06/99 17:30	310,61	31,1%	
	20,00	225,00	07/06/99 17:51	340,91	34,1%	
	20,00	245,00	07/06/99 18:11	371,21	37,1%	
	20,00	265,00	07/06/99 18:32	401,52	40,2%	
	20,00	285,00	07/06/99 18:52	431,82	43,2%	
	20,00	305,00	07/06/99 19:13	462,12	46,2%	
	20,00	325,00	07/06/99 19:33	492,42	49,2%	
	5,00	330,00	07/06/99 19:39	500,00	50,0%	RETIRADA 6 FRASCOS 500 Gy
	20,00	350,00	07/06/99 19:59	530,30	53,0%	
	20,00	370,00	07/06/99 20:20	560,61	56,1%	
	20,00	390,00	07/06/99 20:40	590,91	59,1%	
	20,00	410,00	07/06/99 21:01	621,21	62,1%	
	20,00	430,00	07/06/99 21:21	651,52	65,2%	
	20,00	450,00	07/06/99 21:42	681,82	68,2%	
	20,00	470,00	07/06/99 22:02	712,12	71,2%	
	20,00	490,00	07/06/99 22:23	742,42	74,2%	
	20,00	510,00	07/06/99 22:43	772,73	77,3%	
	20,00	530,00	07/06/99 23:04	803,03	80,3%	
	20,00	550,00	07/06/99 23:24	833,33	83,3%	
	20,00	570,00	07/06/99 23:45	863,64	86,4%	
	20,00	590,00	08/06/99 00:05	893,94	89,4%	
	20,00	610,00	08/06/99 00:26	924,24	92,4%	
	20,00	630,00	08/06/99 00:46	954,55	95,5%	
	20,00	650,00	08/06/99 01:07	984,85	98,5%	
	10,00	660,00	08/06/99 01:17	1000,00	100,0%	RETIRADA 6 FRASCOS 1000 Gy

Tabla 4: Programación para la irradiación.



Figura 5: Cámara Uriglass. Imágen obtenida de www.Biosigma.com.

-Se procedió a irradiar. Se fueron retirando los frascos secuencialmente a medida que alcanzaban la dosis correspondiente.

El tiempo total de irradiación fue de 660 minutos.

La unidad Theratrón 780 (**Fig. 4**) no permite programar más de 20 minutos seguidos de radiación, por lo que se hizo imprescindible reactivar la unidad cada 20 minutos por razones de seguridad. Se muestra en la **Tabla 4** las horas a la que se comenzó a irradiar, el tiempo necesario para alcanzar cada dosis y el tiempo total requerido.

A fin de conocer el efecto de la radiación sobre las tasas de crecimiento, se realizaron medidas cuantitativas dobles (de células vivas) en cámaras Uriglass (Biosigma ref. U9027) (**Fig. 5**) empleando un microscopio de fases en los siguientes períodos de tiempo: **2 horas antes de irradiar, a las 24 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas postirradiación** para cada dosis y línea celular. En todos los casos se efectuó un contaje paralelo de los cultivos control de cada línea.

Se realizó un seguimiento de las líneas teniendo en cuenta morfología y crecimiento hasta más allá de la tercera semana postirradiación para evitar que ningún posible cambio pasase desapercibido.

Para la obtención del número de células por mililitro se multiplicó el número de células contadas por 1000, puesto que el volumen de la cuadrícula es de 1  $\mu$ l. En la **Figura 5** se muestra las características de la cámara.

Con los datos obtenidos se calculó la tasa de crecimiento  $r$  empleando el siguiente modelo matemático para períodos cortos de tiempo:  $Nt=No.e^{rt}$  (Crow y Kimura, 1970). Donde  $No$  engloba los valores iniciales a las 0 horas (ver Adenda) y  $t$  los días postirradiación. Este modelo exponencial de crecimiento es de gran utilidad, pues nos ofrece una idea de la potencialidad de crecimiento o de decrecimiento de una población.

Tras realizar la totalidad de las cuantificaciones postirradiación se llevó a cabo la **fijación de las algas control y las de los frascos** correspondientes a las **dosis de 1000 Gy** a fin de realizar futuros estudios ultraestructurales (cortes ultrafinos, microscopía electrónica y estereología). A tal efecto se realizaron los siguientes pasos:

-Se traspasó cada uno de los contenidos de los frascos Greiner a sendos tubos de precipitados y se centrifugaron a 700 revoluciones por minuto (r.p.m) durante 15 minutos.

-Tras descartar el sobrenadante, se resuspendió el pellet en buffer cacodilato sódico y se centrifugó de nuevo a 700 r.p.m durante otros 15 minutos.

*Preparación del cacodilato: Primero se disolvió a) 2,675g en 125 mL de agua bidestilada. A continuación se mezcló b) 0,06 mL de HCl al 35% en 992 ml de agua bidestilada (HCl 0,1M). La preparación del tampón se realizó mezclando 125 mL del preparado de cacodilato (a) junto con 10,37 g de HCl 0,1M (b) obteniendo un pH de 7,2. Posteriormente añadimos agua bidestilada hasta los 500 mL.*

-Se resuspendió el pellet de nuevo en cacodilato hasta un volumen de 1 ml y se centrifugó en tubos de microscopía electrónica. Se eliminó el sobrenadante.

-Para la fijación se empleó 1 mL de glutaraldehído (al 2,5% en tampón cacodilato). Se añadió poco a poco dejando que resbalase por la pared. Se dejó a temperatura ambiente 15-30 minutos y se guardó en la nevera hasta la posterior fijación.

-Se procedió a la posterior fijación en una mezcla de tetróxido de osmio al 2% (en campana por su elevada toxicidad) y ferrocianuro potásico al 3% diluido en agua bidestilada durante una hora a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces para eliminar bien el osmio.

- El sobrenadante de agua destilada fue eliminado y se deshidrató en concentraciones crecientes de acetona, 15-20 minutos cada una (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y 100%).
- Se infiltró en resina Spurr-acetona sustituyendo el sobrenadante por las diluciones acetona/resina en las proporciones: 1:3 (una hora); 1:1 (una hora) y 3:1 (dos horas). Se tuvo especial cuidado de que no penetrara la luz en la resina.
- Se dejó durante toda la noche en resina pura, tras lo cual se reemplazó dicha resina por la definitiva. Se dejó polimerizar en una estufa a 65°C durante 48 horas.

## ◆ Segunda Fase.

### 1-Las especies de microalgas empleadas.

Procedieron, al igual que las del experimento anterior, de la colección de algas del Departamento de genética y producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (Tabla 5).

Especies empleadas	Hábitat	Tasa de crecimiento	Código de colección	Depósito
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Agua continental de un embalse de Sierra Nevada.	0,98	Clam A	Todas ellas depositadas en la Colección nacional de microalgas de la Universidad Complutense de Madrid.
<i>Chlamydomonas fonticola</i>	Mina de Uranio de Saelices	0,88	Clam Sae	
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Agua continental de una laguna de alta montaña de Sierra Nevada	1,13	DC1M	
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i>	Mina de Uranio de Saelices	1,15	Cloro Sae	

Tabla 5: Especies empleadas, hábitat, tasa de crecimiento, código de colección y procedencia.

### 2-Medios, frascos de cultivo y condiciones de cultivo.

Ambos Géneros fueron aislados según el procedimiento descrito en 2013 por García-Balboa *et al.*

Tanto la metodología de cultivo como la manipulación de las células fueron similares a las del experimento anterior, a excepción del medio de cultivo empleado en las dos líneas de Saelices (adaptadas al uranio): Las especies *Chlamydomonas fonticola* y *Dictyosphaerium ehrenbergianum* se crecieron en un medio (al 2% de BG11 en agua de Saelices) formado por: 980 ml de agua extraída y filtrada de las pozas (con una concentración de uranio de 25 mg/L completamente disuelto en el agua) y 20 ml de BG11 (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany). La incorporación de este medio no cambia sustantivamente el pH del agua inicial de cultivo. Ambas se incubaron en frascos Greiner de 25 ml conteniendo 15 ml de medio. Para *Chlamydomonas reinhardtii* y *Dictyosphaerium chlorelloides* se empleó el medio BG-11 diluido al 2% en agua destilada estéril. Se incubaron, también, en 15 ml de medio en frascos Greiner de 25 ml. Antes de proceder a la irradiación y una vez conocida la tasa de crecimiento de cada línea celular, se ajustó la concentración de los seis frascos iniciales de cada una de las cuatro líneas a una concentración relativamente baja a fin de que durante el período de cultivo postirradiación las células no llegasen a saturación (ver Resultados y Adenda). Con los datos obtenidos se calculó la tasa de crecimiento  $r$  según el procedimiento indicado para el primer experimento.

### 3-Condiciónes de irradiación.

El protocolo de irradiación llevado a cabo fue el mismo que en el experimento anterior. En cuanto a la cuantificación de los efectos de la radiación sobre la tasa de crecimiento, la variación introducida con respecto al experimento anterior consistió en que, además de medir durante los primeros cuatro días postirradiación, se realizó un conteo a las 240 (10 días) y 288 horas (12 días) y se efectuó una observación morfológica a los 17 y 19 días postirradiación.

Se evaluó la **calidad de las mediciones** mediante el sistema de **Intercalibración**. Para ello se tuvieron en cuenta las medidas obtenidas por cuatro observadores; dos de ellos en La Fundación Centro Oncológico de Galicia “José Antonio Quiroga y Piñeyro (en La Coruña) y otros dos en el laboratorio de genética y reproducción animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

A tal efecto se compararon las medidas obtenidas (por los cuatro observadores) a partir de una muestra dada de un cultivo de *Chlamydomonas aeruginosa* en el mismo nivel de crecimiento. El conteo de las células se realizó a la misma hora en ambos laboratorios. Dado que el cultivo presentaba una alta densidad celular (difícilmente cuantificable), procedimos ambos laboratorios a diluir a una concentración 1/10 en agua destilada y posteriormente añadimos tres gotas de formol al 3% para fijar las células y parar así el crecimiento.

Se evaluó: la media, desviación estándar (SD), tamaño de la muestra (N), media del error estándar (SEM), límite de confianza por debajo del 95%, límite de confianza por encima del 95% , el test de Normalidad KS, el valor P del test de normalidad, la validación del test de normalidad y el SEM como porcentaje de la media.

## RESULTADOS

### ♣ Primera Fase.

En la Adenda se adjuntan las tablas con las cifras obtenidas del conteo en los sucesivos días tras la irradiación.

Las Figuras que se adjuntan a continuación expresan el perfil de crecimiento poblacional de cada una de las especie en los cuatro días sucesivos tras la irradiación. Se representa en el eje de ordenadas la cantidad de células por mililitro y en el eje de las abscisas el tiempo en horas postirradiación.

Se presentan primero las curvas de crecimiento de *Dictyosphaerium chlorelloides* (**Fig. 6**) y *Nitzchia closterium* (**Fig. 7**) puesto que ambas ofrecieron patrones de crecimiento medios y relativamente similares, con un plató entre 100 y 250 Gy tras una incubación postirradiación de 48h.

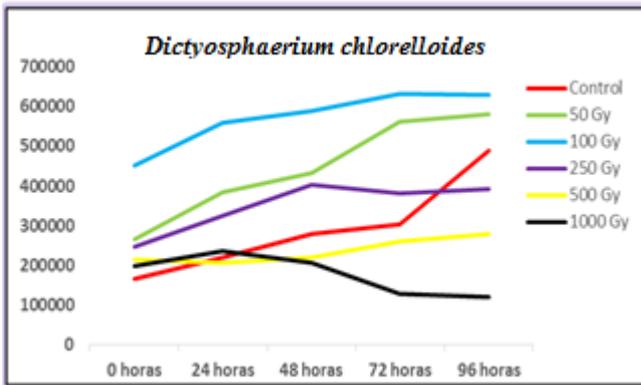


Figura 6. Se muestra el crecimiento poblacional de *D. chlorelloides*.

#### ► *Dictyosphaerium chlorelloides*.

Parece observarse un crecimiento continuo del control. Destaca el incremento continuo en el crecimiento a 50 Gy. A 100 Gy continúa el crecimiento. Se aprecia una meseta a las 48 horas postirradiación a 250 Gy (posiblemente por parada de mitosis). Tras 1000 Gy y 24 horas vemos un declive.

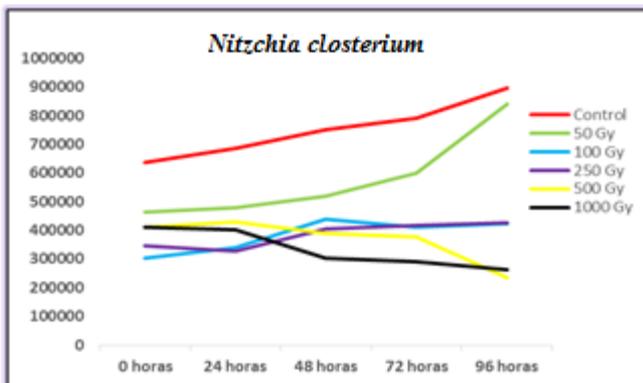


Figura 7. Crecimiento poblacional de *N. closterium*.

#### ► *Nitzschia closterium*.

La dosis de 50 Gy supuso para esta microalga un estímulo del crecimiento. A las 48 horas se observa un plató a 100 y 250 Gy. Comienza a disminuir la densidad poblacional a partir de 500 Gy y 24 horas. Esta microalga creció preferentemente en monocapa y formando acúmulos. Se observó un

claro cambio morfológico en esta especie consistente en una disminución en la longitud y un aumento de la anchura a partir de 250 Gy y 72 horas.

A las tres semanas postirradiación (**Fig. 8**) se observó un cierto incremento en los cambios morfológicos anteriormente citados para *Nitzschia closterium* (**Fig. 9**) (**Fig. 10**).



Figura 8: *N. closterium*. Control. Tres semanas postirradiación. 10x



Figura 9: *N. closterium*. Dosis de 500 Gy. Tras tres semanas postirradiación. 10x

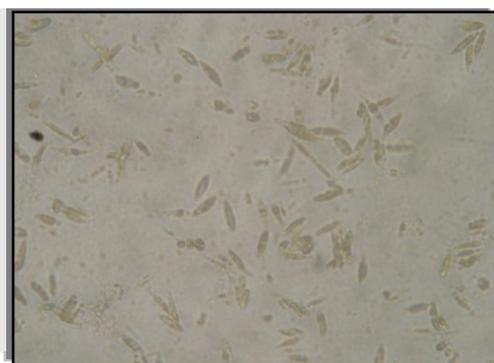


Figura 10 Izquierda: *N. closterium*. Dosis de 1000 Gy. Tres semanas postirradiación. 10x

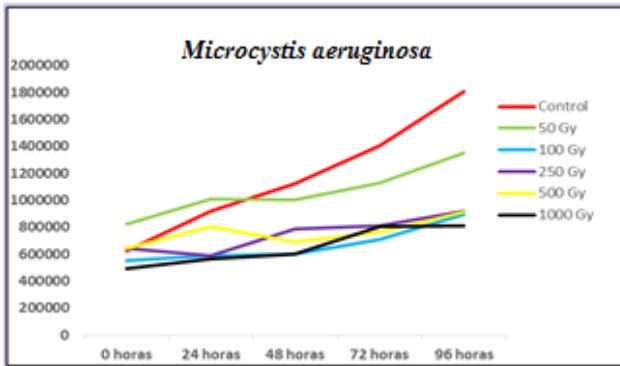


Figura 11. Crecimiento poblacional de *M.aeruginosa*.

Contrariamente a las anteriores *Microcystis* (Fig. 11) mostró ser el alga de mayor radioresistencia de todas las testadas.

#### ► *Microcystis aeruginosa*.

En este caso, la población celular mostró un crecimiento muy similar al del testigo independientemente de la dosis de radiación administrada, aunque a partir de 250 Gy en adelante la tasa disminuye.

Y una evolución absolutamente contraria frente a la radiación se dio en *Emiliana Huxleyi* (Fig. 12) y *Tetraselmis suecica* (Fig. 13), siendo ambas las más radiosensibles de nuestro estudio.

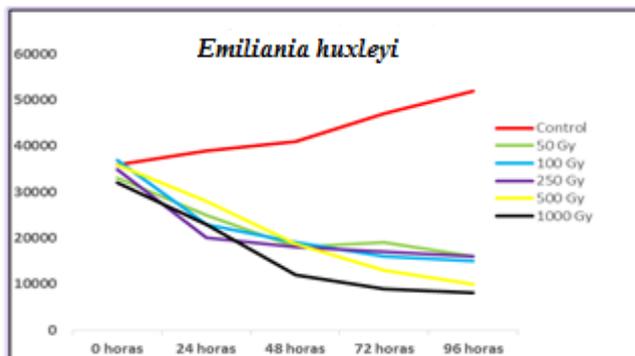


Figura 12. Evolución poblacional en *E. huxleyi*.

#### ► *Emiliana huxleyi*.

Desde el inicio de la incubación, tras haber sido expuesta a radiación gamma, las curvas de crecimiento poblacional disminuyen por lisis celular.

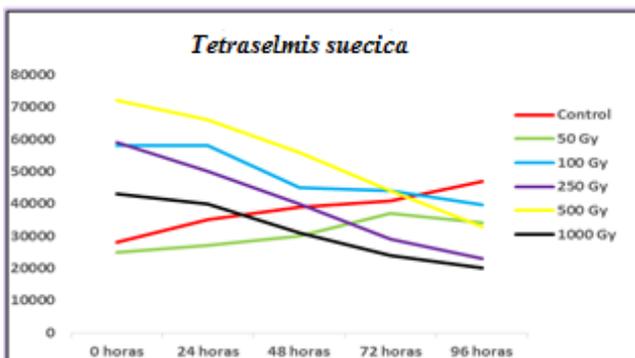
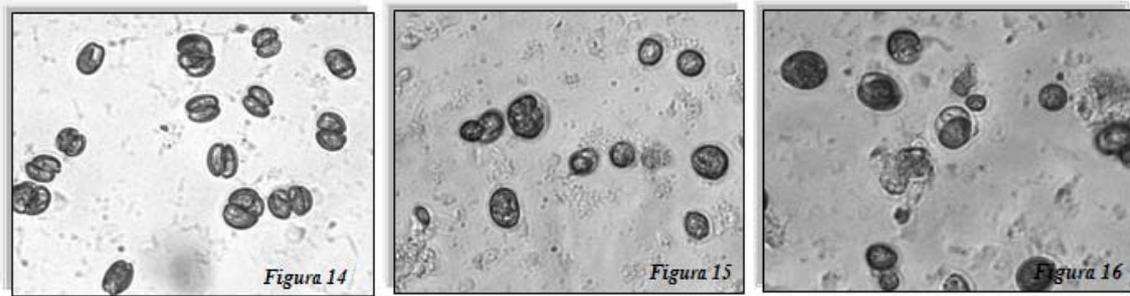


Figura 13. Evolución poblacional en *T. suecica*.

#### ► *Tetraselmis suecica*.

Respecto a *Tetraselmis suecica* (Fig. 13) vemos que la población control y la correspondiente a 50 Gy crecen paralelamente. Tras 24 horas y 100 Gy comienza a disminuir claramente el número celular, siendo muy similar para 500 y 1000 Gy.

Pero lo más llamativo lo encontramos en el cambio morfológico observado ya desde las 24 horas postirradiación y a la dosis de 1000 Gy. El cambio en la forma va desde las típicas imágenes arriñonadas observables en el cultivo control (Fig. 14) a esferas muy dilatadas (Fig. 15) y estructuralmente irregulares (Fig. 16) en el cultivo de 1000 Gy. Las fotos se realizaron a las tres semanas postirradiación con contraste de fases y objetivo de 60x (empleando el software NIS-elements de Nikon).



Cambios morfológicos observados en *T. suecica* tras tres semanas postirradiación en el cultivo control (Fig. 14) y 1000 Gy (Fig. 15) (Fig. 16). 60x

### ► *Prorocentrum lima*.

Debido a la escasísima densidad de población inicial de la que se disponía y a que esta especie satura *in vitro* a 3000-4000 cls/ml, nos vimos obligados a elegir únicamente tres puntos de análisis: control, 250 Gy y 1000 Gy. A tal efecto, en lugar de cuantificar el número de células por mililitro, se calculó el porcentaje (en %) de células morfológicamente intactas entre las 0 horas y las 96 horas postirradiación (**Tabla 6**).

Dosis	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Control	52,84 %	53,85%	52,63%	55,91%	63,93%
250 Gy	51,85%	47,62%	46,66%	46,46%	46,00%
1000 Gy	55,36%	46,40%	46,34%	39,77%	37,77%

Tabla 6: Células, en %, de *P. lima* morfológicamente intactas.

Si bien el control parece crecer ligeramente, a 250 Gy se detiene el crecimiento y a 1000 Gy la disminución en el crecimiento poblacional sucede desde las primeras horas postirradiación.

En este caso también se observó un cambio morfológico a partir de las 72 horas a dosis de 250 Gy, protagonizado por la presencia de una vacuola de gran tamaño tras el núcleo y en posición opuesta a la zona flagelar. A dosis de 1000 Gy (**Fig. 17**) sólo se observaron restos celulares.



Figura 17: Restos celulares de *P. lima* tras una dosis de 1000 Gy y 72 horas postirradiación. 60x



Figura 18: Claros cambios en las densidades poblacionales de *N. closterium*, *D. choroeloides* y *M. aeruginosa* evidenciadas por la diferencia de color entre los cultivos control y los sometidos a 1000 Gy a las 96 horas postirradiación.

Se hizo muy evidente, incluso a nivel macroscópico, las diferencias entre poblaciones control y poblaciones sometidas a 1000 Gy de *Nitzchia closterium*, *Dictyosphaerium chorelloides* y *Microcystis aeruginosa* a las 96 horas postirradiación (**Fig 18**).

Se ha calculado la tasa de crecimiento  $r$  a lo largo de los cuatro días empleando el siguiente modelo matemático para periodos cortos de tiempo:  $Nt=No.e^{(rt)}$ . Los valores iniciales,  $No$ , se corresponden a los valores a las 0 horas (ver Adenda) y  $t$  a los días postirradiación.

**Valores de  $r$  tras 24 horas,  $t=1$**

<i>Especies</i>	<i>Control</i>	<i>50 Gy</i>	<i>100 Gy</i>	<i>250 Gy</i>	<i>500 Gy</i>	<i>1000 Gy</i>
<i>Dictyosphaerium chorelloides</i>	0,2816	0,3746	0,2142	0,2784	-0,0380	0,1705
<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,3838	0,2064	0,0665	-0,0827	0,2219	0,1406
<i>Nitzchia closterium</i>	0,0742	0,0339	0,1119	-0,0535	0,0380	-0,0190
<i>Emiliania huxleyi</i>	0,0800	-0,2776	-0,4754	-0,5596	-0,2513	-0,3302
<i>Tetraselmis suecica</i>	0,2230	0,0769	0,0000	-0,1655	-0,0870	-0,0723

**Valores de  $r$  tras 48 horas,  $t=2$**

<i>Especies</i>	<i>Control</i>	<i>50 Gy</i>	<i>100 Gy</i>	<i>250 Gy</i>	<i>500 Gy</i>	<i>1000 Gy</i>
<i>Dictyosphaerium chorelloides</i>	0,2614	0,2462	0,1332	0,2455	0,0138	0,0197
<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,2924	0,1012	0,0416	0,1030	0,0344	0,1029
<i>Nitzchia closterium</i>	0,0837	0,0569	0,1848	0,0789	-0,0274	-0,1495
<i>Emiliania huxleyi</i>	0,0650	-0,3030	-0,3332	-0,3324	-0,3274	-0,4904
<i>Tetraselmis suecica</i>	0,1656	0,0911	-0,1268	-0,1943	-0,1256	-0,1636

**Valores de  $r$  tras 72 horas,  $t=3$**

<i>Especies</i>	<i>Control</i>	<i>50 Gy</i>	<i>100 Gy</i>	<i>250 Gy</i>	<i>500 Gy</i>	<i>1000 Gy</i>
<i>Dictyosphaerium chorelloides</i>	0,2016	0,2518	0,1117	0,1458	0,0649	-0,1470
<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,2703	0,1068	0,0839	0,0774	0,0552	0,1650
<i>Nitzchia closterium</i>	0,0731	0,0856	0,1013	0,0639	-0,0304	-0,1131
<i>Emiliania huxleyi</i>	0,0888	-0,1840	-0,2794	-0,2407	-0,3395	-0,4228
<i>Tetraselmis suecica</i>	0,1271	0,1306	-0,0920	-0,2367	-0,1641	-0,1943

**Valores de  $r$  tras 96 horas,  $t=4$**

<i>Especies</i>	<i>Control</i>	<i>50 Gy</i>	<i>100 Gy</i>	<i>250 Gy</i>	<i>500 Gy</i>	<i>1000 Gy</i>
<i>Dictyosphaerium chorelloides</i>	0,2695	0,1967	0,0822	0,1158	0,0672	-0,1264
<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,2662	0,1250	0,1210	0,0899	0,0864	0,1256
<i>Nitzchia closterium</i>	0,0856	0,1483	0,0831	0,0527	-0,1392	-0,1100
<i>Emiliania huxleyi</i>	0,0919	-0,1809	-0,2257	-0,1956	-0,3202	-0,3434
<i>Tetraselmis suecica</i>	0,1294	0,0768	-0,0954	-0,2355	-0,1950	-0,1913

Estos datos aportan una lectura concordante con las representaciones ya expuestas del crecimiento poblacional para cada especie. Un ejemplo para entender cómo se interpretan estos datos sería el siguiente: *Dictyosphaerium chorelloides* presenta un

valor de  $r = 0,2142$  para una dosis de 100 Gy tras 24 horas postirradiación, por lo que la población aumentó durante ese período de tiempo (desde las dos horas preirradiación a las 24 horas postirradiación) en 214 células cada 1000. A los cuatro días y a la misma dosis el valor de  $r$  para esta microalga fue de 0,0822, por lo que hubo un incremento de 82 células cada 1000 (desde las dos horas preirradiación a las 96 horas postirradiación). Así mismo, también puede expresarse estos valores en % de crecimiento; por ejemplo, 8,2% fue la tasa de crecimiento a dosis de 100 Gy tras cuatro días postirradiación. Es necesario tener en cuenta que la disminución de la tasa de crecimiento de un día a otro no significa necesariamente que la población haya disminuido, sino que puede significar que esté creciendo a un ritmo más lento que antes. Una tasa de crecimiento negativo, en cambio, indica pérdida de población. Considerando que esta tasa de crecimiento se basa en un modelo de crecimiento exponencial continuo entre dos puntos en el tiempo y que no tiene en cuenta los valores intermedios de la serie, nos pareció más representativo mostrar la evolución del crecimiento de las poblaciones empleando el contaje celular directo, el cual permite ver la tendencia progresiva de la curva de crecimiento en cada especie.

## ♣ Segunda Fase.

### *Chlamydomonas fonticola (Saelices)*

Valorando los niveles de crecimiento, movilidad celular y morfología en relación a la dosis y al período de tiempo transcurrido tras la exposición, se ha observado:

Una evolución de la **población control** de acuerdo al crecimiento exponencial esperado y sin alteraciones morfológicas.

En cuanto a las **curvas de crecimiento** (ver valores en Adenda) para las distintas dosis y durante los primeros cuatro días postirradiación se registró (**Fig. 19**):

- Tendencia al crecimiento, salvo una disminución a la dosis de 50 Gy a las 48 horas, el cual, posiblemente se trate de un artefacto.

- A dosis de 1000 Gy y tras 96 horas transcurridas se observa una disminución en el crecimiento, posiblemente debido a problemas en las reparaciones del material genético.

- Se dejó evolucionar durante más tiempo los cultivos de 500 y 1000 Gy para comprobar si se producían cambios significativos, tanto en el crecimiento como en la morfología y movilidad; como se observa en la gráfica, se registró un descenso de ambas poblaciones a las 240 y 288 horas postirradiación, siendo más acusado en la dosis de 1000 Gy.

- A los 19 días es evidente la diferencia en la densidad poblacional del control (**Fig. 20**) respecto a la dosis de 1000 Gy (**Fig. 21**).

En cuanto a la **movilidad**:

- Partió de un 35-38% aproximadamente (calculado por contaje directo).

- No se observaron cambios hasta las 72 horas a dosis de 1000 Gy, momento en el que se reduce claramente la movilidad, continuando hasta más allá de las 96 horas, hasta alcanzar un valor del 10%. A las 240 horas la movilidad era de un 2% a dicha dosis. A las 288 horas en el punto de 500 Gy la movilidad era de un 1 % y nula a esa hora para la dosis de 1000 Gy.

Se observaron **cambios morfológicos**:

- Ya a las 48 horas en los cultivos de 100 Gy. A las 72 horas se observa por primera vez una célula de apariencia viva, con una prolongación similar al del mango de

una maraca y acabada en un punto de color intenso (en total se observaron unas 3-4 con dicho aspecto).

- En 250 Gy (a las 48 horas) se observó la presencia de algunas células de mayor tamaño y más ovaladas comparadas con las del control.

- Lo mismo se registró para las dosis de 500 y 1000 Gy. A las 72 horas se observaban algunas células en fase de lisis (sobre un 2% con aspecto claramente más pálido) y otras con un mayor tamaño comparadas con las control (sobre un 3%). Tras 96 horas los cambios en tamaño se registraron en un mayor número de células, al igual que las registradas en fase de lisis.

- Pero la gran capacidad mostrada por estas algas de conservar su morfología pudo comprobarse tras 240 y 288 horas. De hecho la tasa de células morfológicamente intactas tras 10 días fue de un 70 % en 500 Gy y de un 55% en la dosis de 1000 Gy.

### *Chlamydomonas reinhardtii* (Colección)

Como en el caso de Saelices (**Fig. 22**) la tendencia al **crecimiento** no pareció detenerse durante los primeros cuatro días para las dosis entre 100 y 250 Gy, salvo a las 72 horas y dosis de 1000 Gy donde se acusa un descenso en el crecimiento, el cual se verá acentuado a dosis de 500 y 1000 Gy a partir de las 96 horas (Ver tablas Adenda).

En cuanto a la **movilidad celular**:

- Inicialmente se estimó en 32-38%.

- Se observó una disminución en relación al incremento de dosis y de días transcurridos.

- Estas células se mostraron mucho más radiosensibles que las procedentes de Saelices. Así, si bien a las 24 horas, tanto a dosis de 500 como de 1000 Gy, las microalgas de colección mostraron una buena movilidad (25-26%), a las 48 horas en dosis de 500 Gy se detecta tan solo alguna movilidad (sobre un 3%) y a dosis de 1000 Gy es nula. A 500 Gy se detiene al cuarto día postirradiación.

- Tras 19 días (**Fig. 23**) podemos confirmar la radiosensibilidad de esta microalga (mayor que la mostrada por *Chlamydomonas fonticola*) observando la diferencia en la densidad poblacional (**Fig. 24**).

Respecto a la **morfología**:

- Tras 24 horas comienzan a aparecer agrupaciones de 3-4 células en los cultivos correspondientes a las dosis de 500 y 1000 Gy. A las 48 horas, además de las tétradas, se observó que algunas células aumentaron de tamaño.

- A las 72 horas este aumento en el tamaño en algunas células se detectó a partir de 100 Gy. A esta dosis comienzan a aparecer también fragmentos celulares.

- A dosis de 500 y 1000 Gy, en el mismo punto horario, se observan cada vez más agrupaciones de 4 células y un aumento en el número de fragmentos pequeños.

- Tras 96 horas, tanto a la dosis de 250, 500 como a la de 1000 Gy, se registra un aumento en la cantidad de agrupaciones con mayor número de células (de cuatro a nueve células). En 500 y en 1000 Gy se detectó mayor cantidad de células en fase de lisis.

- Tras 240 y 288 horas se observó que la mayoría de las estructuras visibles eran células en fase de deterioro o bien agrupaciones de entre cinco y diez células de aspecto conservado (8% de células morfológicamente intactas a 1000 Gy tras 10 días).

Figura 19: Representación gráfica del crecimiento de *C. fonticola* a diferentes dosis y tiempos.

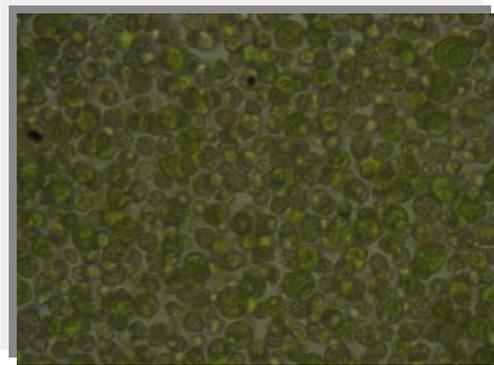
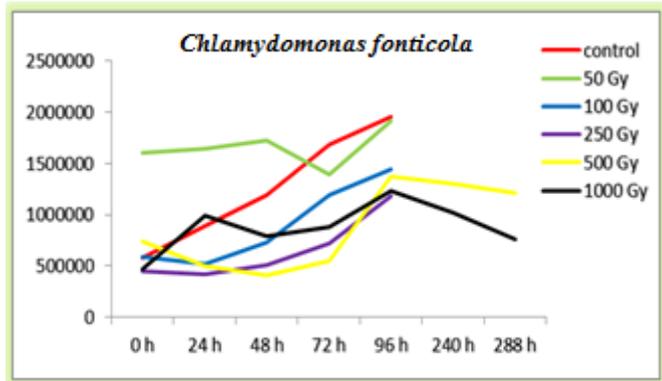


Figura 20: *C. fonticola*. Control. Día 19. 10x



Figura 21: *C. fonticola*. 1000 Gy. Día 19. 10x

Figura 22: Representación evolutiva del crecimiento de *C. reinhardtii* a diferentes dosis y tiempos.

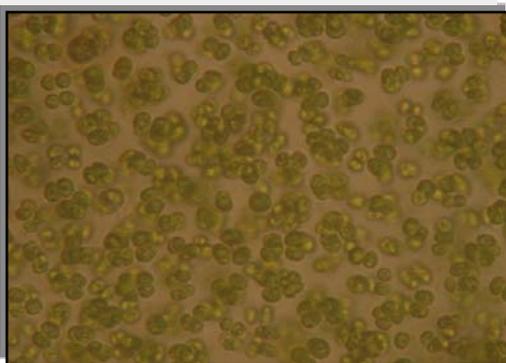
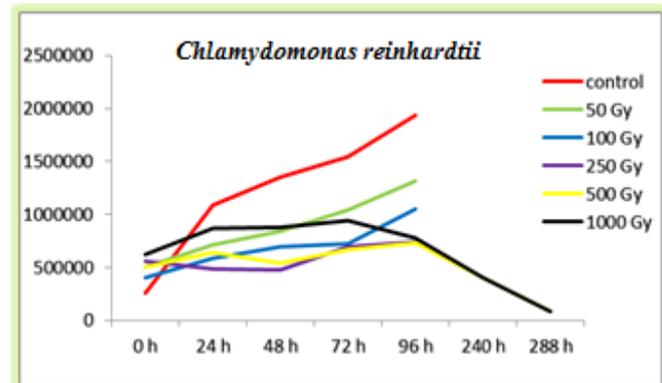


Figura 23: *C. reinhardtii*. Control. Día 19. 10x

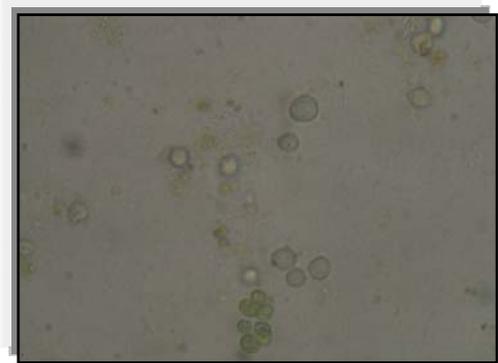


Figura 24: *C. reinhardtii*. 1000 Gy. Día 19. 10x

### *Dictyosphaerium ehrenbergianum* (Saelices)

#### Respecto al **crecimiento**:

- Todas las curvas hasta la correspondiente a la dosis de 250 Gy inclusive se muestran aproximadamente paralelas en su evolución respecto al control, hasta las 72 horas en que en 100 y 250 Gy se aprecia una disminución muy discreta (ver valores en Adenda) en la cinética de crecimiento poblacional (**Fig. 25**).

- En cuanto a 500 y 1000 Gy observamos un inicio casi plano durante las primeras 48 horas.

- Se aprecia un incremento en el crecimiento a dosis de 1000 Gy a partir de las 48 horas y a las 72 horas en los frascos de 500 Gy.

- A 240 y 288 horas si bien la población de 500 Gy se recuperó y continuaba creciendo, no ocurrió así para la dosis de 1000 Gy, la cual mostró un descenso.

- A los 19 días (**Fig. 26**) es apreciable las diferencias entre el cultivo control y el sometido a dosis de 1000 Gy (**Fig. 27**).

#### En cuanto a **la morfología**:

- Durante las primeras 24 horas no hay cambios en las dosis de 50 y 100 Gy.

- El primer día postirradiación y a las dosis de 250, 500 y 1000 Gy comienza a verse un aumento en el tamaño celular.

- A las 48 horas y a dosis de 1000 Gy se muestran ya algunas células pálidas y más pequeñas.

- Tras 72 horas y a la misma dosis se vio un aumento de células en fase de desintegración y un ligero aumento de tamaño en muchas de las morfológicamente intactas.

- A las 96 horas y a 1000 Gy se detectó un ligero aumento en el número de células en fase de lisis.

- A 240 horas postirradiación se detectó una diferencia clara entre el cultivo de 500 y de 1000 Gy, pues en el primero se estimó un 60% de células morfológicamente intactas y un 40% en el segundo.

### *Dictyosphaerium chlorelloides* (colección)

#### **Crecimiento poblacional:**

- Ascendente y muy paralelo al control desde las dosis de 50 a 250 Gy inclusive.

- Claro plató desde el inicio para las dosis de 500 y 1000 Gy con una recuperación a partir de las 72 horas para la dosis de 500 Gy, la cual parece detenerse a las 240 horas (**Fig. 29**).

- A 1000 Gy se detecta un claro descenso en el crecimiento desde las 96 horas postirradiación.

- Tras 19 días vemos el abrupto descenso en la densidad poblacional cuando se comparan el cultivo control con el sometido a 1000 Gy (**Fig. 30**). Además es destacable la mayor radiosensibilidad de esta alga en comparación con *Dictyosphaerium ehrenbergianum* (**Fig. 25**).

#### En cuanto a **la morfología**:

- Durante las primeras 24 horas no se observan cambios significativos.

- Tras 72 horas se aprecian cambios muy marcados en formas y tamaños (mayor tamaño y menos redondeadas) a 500 y 1000 Gy.

- A las 240 horas se registró un 30% de células morfológicamente intactas para una dosis de 500 Gy, disminuyendo apreciablemente en la dosis de 1000 Gy (10%).

Figura 25: Evolución en el crecimiento de *D. ehrenbergianum* a diferentes dosis y tiempos.

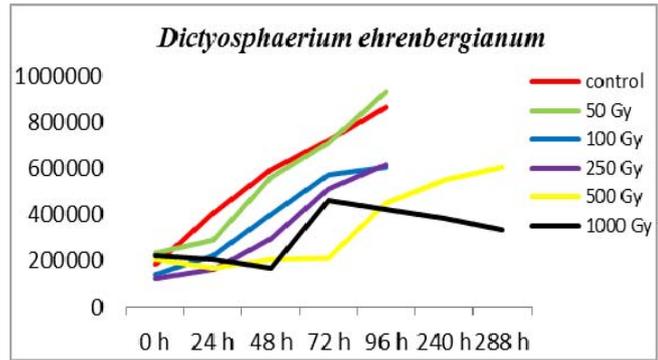


Figura 26: *D. ehrenbergianum*. Control. Día 19. 10x

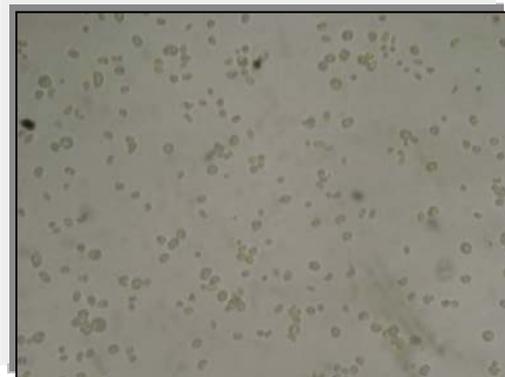


Figura 27: *D. ehrenbergianum* 1000 Gy. Día 19. 10x

Figura 28: Representación del crecimiento para *D. chlorelloides* a diferentes dosis y tiempos.

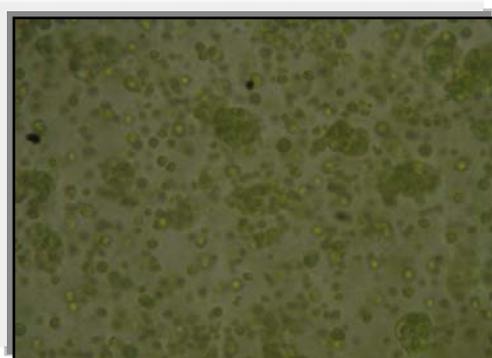
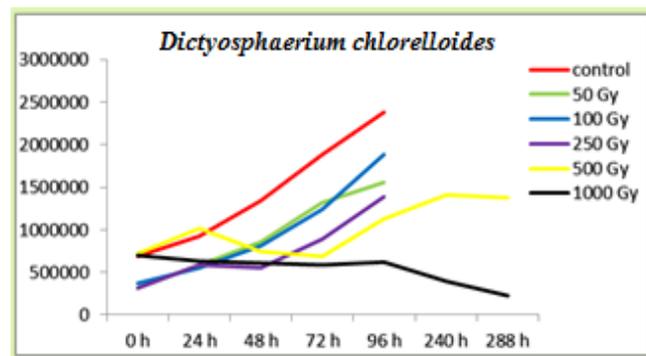


Figura 29: *D. chlorelloides* control. Día 19. 10x



Figura 30: *D. chlorelloides*. 1000 Gy. Día 19. 10x

Al igual que en el experimento anterior, se ha calculado la tasa de crecimiento  $r$  a lo largo de los seis días empleando el mismo modelo de crecimiento poblacional exponencial para periodos cortos de tiempo:  $N_t = N_0 \cdot e^{(rt)}$ .

**Valores de r tras 24 horas, t=1**

<i>Especies</i>	<i>Control</i>	<i>50 Gy</i>	<i>100 Gy</i>	<i>250 Gy</i>	<i>500 Gy</i>	<i>1000 Gy</i>
<i>Chlamydomonas fonticola</i>	0,4213	0,0221	-0,1118	-0,0553	-0,3786	0,7552
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1,4547	0,3471	0,3669	-0,1422	0,2490	0,3443
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i>	0,7914	0,2300	0,4700	0,2635	-0,1920	-0,0792
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	0,3007	0,6163	0,3965	0,6226	0,3483	-0,0993

**Valores de r tras 48 horas, t=2**

<i>Especies</i>	<i>Control</i>	<i>50 Gy</i>	<i>100 Gy</i>	<i>250 Gy</i>	<i>500 Gy</i>	<i>1000 Gy</i>
<i>Chlamydomonas fonticola</i>	0,3559	0,0349	0,1112	0,0650	-0,2901	0,2605
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0,8345	0,2558	0,2666	-0,0836	0,0364	0,1767
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i>	0,5842	0,4414	0,5274	0,4236	-0,0048	-0,1416
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	0,3362	0,4956	0,3857	0,2807	0,0163	-0,0723

**Valores de r tras 72 horas, t=3**

<i>Especies</i>	<i>Control</i>	<i>50 Gy</i>	<i>100 Gy</i>	<i>250 Gy</i>	<i>500 Gy</i>	<i>1000 Gy</i>
<i>Chlamydomonas fonticola</i>	0,3522	-0,0477	0,2361	0,1596	-0,0964	0,2104
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0,6007	0,2401	0,1928	0,0736	0,0962	0,1412
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i>	0,4547	0,3719	0,4691	0,4673	0,0064	0,2406
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	0,3370	0,4734	0,3995	0,3451	-0,0141	-0,0560

**Valores de r tras 96 horas, t=4**

<i>Especies</i>	<i>Control</i>	<i>50 Gy</i>	<i>100 Gy</i>	<i>250 Gy</i>	<i>500 Gy</i>	<i>1000 Gy</i>
<i>Chlamydomonas fonticola</i>	0,3026	0,0449	0,2247	0,2432	0,1553	0,2415
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0,5072	0,2391	0,2370	0,0719	0,0942	0,0562
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i>	0,3866	0,3465	0,3654	0,3963	0,1964	0,1582
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	0,3121	0,3975	0,4050	0,3706	0,1122	-0,0280

Valores de  $r$  tras 240 horas,  $t=10$

Especies	500 Gy	1000 Gy
<i>Chlamydomonas fonticola</i>	0,0568	0,0779
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	-0,0222	-0,0422
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i>	0,0983	0,0536
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	0,0672	-0,0571

Valores de  $r$  tras 288 horas,  $t=12$

Especies	500 Gy	1000 Gy
<i>Chlamydomonas fonticola</i>	0,0414	0,0404
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	-0,1451	-0,1673
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i>	0,0893	0,0341
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	0,0539	-0,0947

### Una visión morfológica más detallada

Empleando microscopio de contraste de fases con un objetivo 20x y cámaras Uriglass se obtuvieron las siguientes imágenes que intentan mostrar los cambios morfológicos encontrados y citados anteriormente. No pretende ser una representación de la densidad poblacional, pues estas fotografías corresponden, tan sólo, a una región de la celdilla de una celda de las de las diez existentes en cada cámara Uriglass.

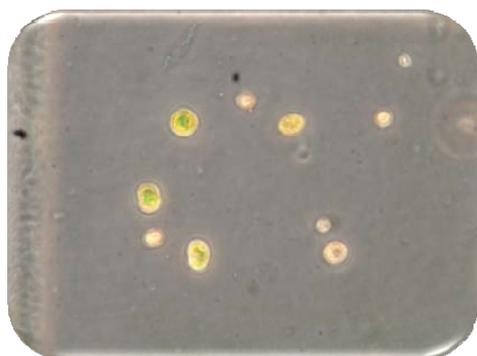


Figura 31: *C. fonticola*. 500 Gy. Día 17. 20x

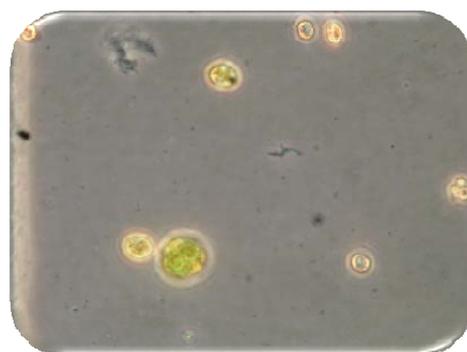


Figura 32: *C. fonticola*. 1000 Gy. Día 17. 20x

En el caso de *Chlamydomonas fonticola* se aprecian cambios morfológicos marcados en 500 Gy (**Fig. 31**) a los 17 días postirradiación, como un aumento de tamaño. No se apreciaron sombras vacías, es decir, en proceso de lisis (a las 240 horas, 10 días, el porcentaje de células morfológicamente intactas es del 70%). A 1000 Gy (**Fig. 32**) como ya se mencionó, se observan algunas células muy grande y además con un gran cloroplasto de color verde intenso y el citoplasma de color naranja intenso (a esta dosis y al día 10 postirradiación se observó un 55% de células morfológicamente intactas).

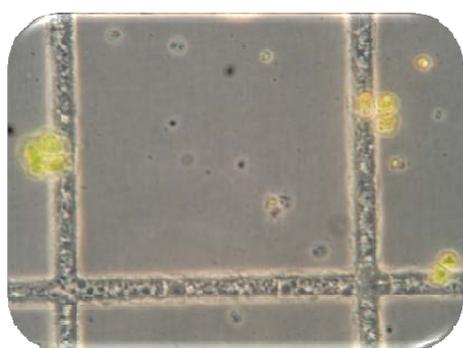


Figura 33: *C. reinhardtii*. 500 Gy. Día 17. 20x

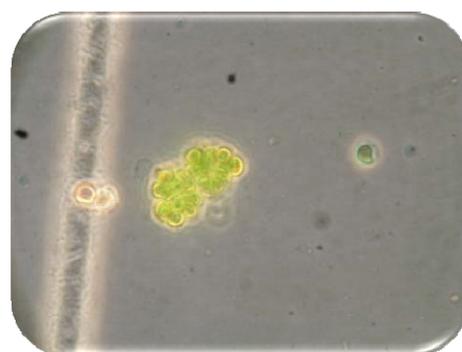


Figura 34: *C. reinhardtii*. 1000 Gy. Día 17. 20x

En el caso de *Chlamydomonas reinhardtii* y tras 240 horas para dosis de 500 (40% de células morfológicamente intactas) y 1000 Gy (8% de células morfológicamente intactas), se apreció que la mayoría de las células se mostraban en fase de deterioro o en grupos de entre cinco y diez células de aspecto bastante conservado. Siete días después, tanto en 500 Gy (**Fig. 33**) como en 1000 Gy (**Fig. 34**) las células, intactas morfológicamente, aparecen agrupadas en conjuntos de 7-12 unidades pero con un ligero aumento en su tamaño (comparadas con las morfológicamente intactas del cultivo control). En ambas dosis se halló un elevado número de células en fase de lisis, siendo mayor el número en la dosis de 1000 Gy.

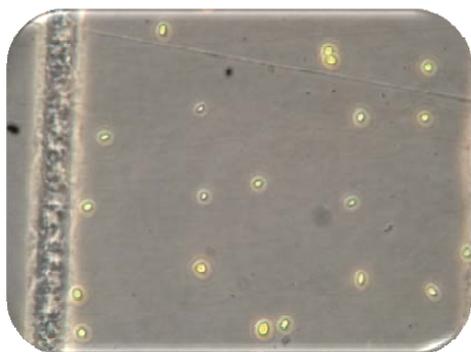


Fig 35: *D. ehrenbergianum*. 500 Gy. Día 17. 20x

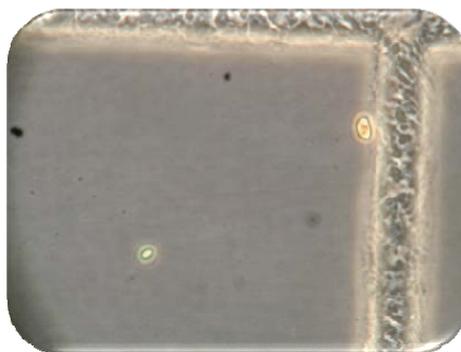


Figura 36: *D. ehrenbergianum*. 1000 Gy. Día 17. 20x

A las 240 horas postirradiación se aprecia una clara diferencia entre el cultivo de 500 y de 1000 Gy en *Dictyosphaerium ehrenbergianum*, pues en el primero de ellos se estima aproximadamente la presencia de un 60% de células intactas y de un 40% en el segundo. Al día 17 y en 500 Gy (**Fig. 35**) apreciamos que hay un cierto número de células que siguen mostrando buen aspecto (forma bien conservada). A dosis de 1000 Gy (**Fig. 36**) aumenta el número de células en estado de lisis y las que no lo están presentan un color más intenso y un aumento del tamaño celular (detalle que no se aprecia bien en las fotos correspondientes a los frascos de cultivo de 1000 Gy a las 240 horas tras irradiación).

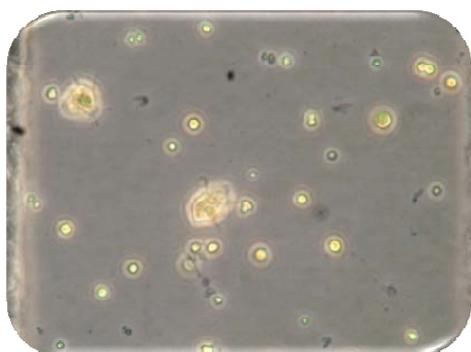


Figura 37: *D. chlorelloides*. 500 Gy. Día 17. 20x

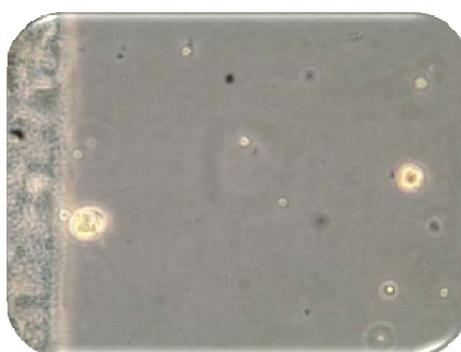


Figura 38: *D. chlorelloides*. 1000 Gy. Día 17. 20x

Para *Dictyosphaerium chlorelloides* y tras 240 horas las cifras registradas fueron de un 30% de células morfológicamente intactas en la dosis de 500 Gy, disminuyendo apreciablemente en la dosis de 1000 Gy (10%). Al día 17 vimos que en la dosis de 500 Gy (**Fig. 37**) había una cierta cantidad de células de aspecto normal, sobre un 20-25%, pero de color muy intenso, mientras que otras se mostraban muy alteradas

morfológicamente (color más intenso, más grandes, más brillantes debido al estrés, etc.), quizás porque comenzaban a entrar en el proceso de lisis. En 1000 Gy (**Fig. 38**) la gran mayoría de las células observadas estaban ya en proceso de lisis. También se apreció a esta dosis la presencia de fragmentos celulares. Tras 18 días (**Fig. 39**) pueden observarse los cambios de tonalidad a simple vista de las distintas líneas celulares según la dosis (**Fig. 40**), diferencia que se intensifica al comparar cultivos control con sometidas a 1000 Gy (**Fig. 41**).



Figura 39: Frascos de cultivo correspondientes al día 18 mostrando las diferentes tonalidades de color según densidad de población y dosis.



Figura 40 y Figura 41: Frascos de cultivo correspondientes al día 18 (obsérvese las diferentes tonalidades del control respecto al frasco irradiado con 1000 Gy).

A fin de conocer la fiabilidad de nuestras mediciones, se muestra a continuación los **resultados de la Intercalibración** entre La Fundación Centro Oncológico de Galicia “José Antonio Quiroga y Piñeyro” (en La Coruña) y el laboratorio de genética y reproducción animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (**Tabla 7**).

Se evaluó: la media, desviación estándar (SD), tamaño de la muestra (N), media del error estándar (SEM), límite de confianza por debajo del 95%, límite de confianza por encima del 95% , el test de Normalidad KS, el valor P del test de normalidad, la validación del test de normalidad y el SEM como porcentaje de la Media.

Tabla 7: Se muestran los valores del contejo directo de cada una de las diez mediciones obtenidas por cada observador.

1º Observ.	2º Observ.	1º Observ.	2º Observ.
La Coruña		Madrid	
1081	1062	1115	1103
1122	1012	1109	1196
1208	1161	1098	1084
1058	1128	1093	1123
1185	1278	1111	1077
1204	1192	1117	1091
1151	1091	1123	1089
1112	1149	1109	1112
1206	1138	1099	1114
1123	1111	1100	1124

	1° Observ.	2° Observ.	1° Observ.	2° Observ.
	Coruña	Coruña	Madrid	Madrid
Mean	1145	1132,2	1107,4	1111,3
Standard deviation (SD)	54,338	72,663	9,6171	33,961
Sample size (N)	10	10	10	10
Std. error of mean (SEM)	17,183	22,978	3,0412	10,739
Lower 95% conf. limit	1106,1	1080,2	1100,5	1087
Upper 95% conf. limit	1183,9	1184,2	1114,3	1135,6
Normality test KS	0,1692	0,1459	0,1792	0,2542
Normality test P value	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10
Passed normality test?	yes	yes	yes	yes
SEM as % of Mean	1.5%	2.0%	0.3%	1,00%

Tabla 8: Valoración estadística obtenida a partir de las mediciones realizadas por los cuatro observadores.

Realizamos un test de bondad de ajuste para saber si nuestros datos se distribuyen normalmente. Una vez comprobado que esto es así (empleando el test de normalidad de Kolmogórov-Smirnov. Tanto el valor de significancia asintótica como el  $p$  valor obtenido para los cuatro observadores se sitúan por encima del nivel de significancia del 0,05 (para un 95% de confianza), utilizamos estadística paramétrica incluida en el paquete estadístico SPSS para obtener la estadística descriptiva correspondiente a los resultados obtenidos (Tabla 8). Tanto los valores de la desviación estándar como del error estándar de la media se sitúan dentro de lo aceptable. Los intervalos de confianza por encima y por debajo del 95% muestran un tamaño de incertidumbre relativamente bajo. En todos los casos hemos obtenido valores menores al 2% para el error estándar de la media (en %). Además, el error estándar de la reproducibilidad y de la repetibilidad se sitúa por debajo del 5% como ya se ha mencionado.

## DISCUSIÓN

Diversas especies de bacterias, levaduras, hongos y plantas muestran una capacidad incrementada de resistir a diversos tipos y dosis de radiación (Kraus, 1969). En este sentido, las microalgas muestran una particular capacidad debido a la estructura de su pared celular (Kalin *et al.*, 2005) (García-Balboa *et al.*, 2013). En base a esta propiedad, algunas especies han sido empleadas como biorremediadores capaces de eliminar radioisótopos presentes en el medioambiente (García-Balboa *et al.*, 2013). Recientemente se han venido estudiando en detalle diversas cianobacterias (*Arthrospira platensis* y *Arthrospira maxima*) y microalgas en las que algunos de sus componentes mostraron un efecto protector en mamíferos superiores y humanos contra las lesiones inducidas por exposición a radiaciones ionizantes (Zhang *et al.*, 2001). Y en particular el *G. Chlorella*, en la que se ha detectado una notable supervivencia tras dosis muy elevadas de radiación (Martínez y Fernández, 1983).

- **Primera Fase.** Desde los años 60 del pasado siglo se ha ido corroborando que los protistas muestran capacidades anormalmente altas de radioresistencia en comparación con muchos otros organismos unicelulares. La gran mayoría de los estudios publicados

se han limitado a investigar el comportamiento de las curvas de crecimiento de una única especie en cada caso.

En un intento de explorar este concepto, se ha valorado en una primera fase de este estudio el comportamiento de seis especies de microalgas frente a un amplio rango de dosis agudas de radiación gamma. A tal efecto, se ha seguido sus respuestas evaluando la tendencia de las curvas de supervivencia registradas de estas poblaciones in Vitro, así como los posibles cambios morfológicos surgidos.

*Dictyosphaerium chlorelloides* mostró un crecimiento exponencial durante las primeras 24 horas postirradiación (del 28% para el control) incluso a dosis de 1000 Gy ( $r = 17,05\%$ ). Su radiosensibilidad se manifestó a partir de los 250 Gy tras 48 horas. La dosis de 500 Gy parece establecer el límite probable de supervivencia observándose la población celular estacionada (la tasa de crecimiento  $r$  para dosis de 500 Gy tras uno, dos, tres y cuatro días respecto al punto de partida son, respectivamente;  $-3,80\%$ ,  $1,38\%$ ,  $6,49\%$  y  $6,72\%$ ) con claros signos de bloqueo reproductivo según pasan los días. Dicha circunstancia se vio modificada a 1000 Gy y a las 48 horas, punto en el que el número celular desciende claramente (de un valor de  $r = 19,70\%$  tras 48 horas a  $r = -12,64\%$  tras 96 horas) mostrando un deterioro en la mayoría de las células tanto cuantitativo como morfológico ( $r = -12,6\%$  al cuarto día postirradiación respecto al  $r = 17,05\%$  tras 24 horas).

*Nitzschia closterium* muestra, a partir de las 48 horas, un plató entre los 100 y los 250 Gy. A partir de las 24 horas postirradiación, la dosis de 500 ( $r = -13,92\%$  al cuarto día respecto al punto de inicio) y 1000 Gy ( $r = -11,00\%$ ) indujeron en su población una disminución en la densidad celular. En este organismo apreciamos un claro cambio morfológico consistente en una disminución de la longitud y en un aumento de la anchura a partir de los 250 Gy y tras 72 horas. Este cambio se mantuvo durante las siguientes tres semanas de observación.

Al igual que ocurrió con *Dictyosphaerium chlorelloides*, la dosis de 50 Gy ( $r = 19,67\%$  respecto al punto de inicio para *D.chlorelloides*) pareció inducir, tras cuatro días, una estimulación en la reproducción celular ( $r = 14,83\%$  para *N.closterium*).

Quisiéramos poner el punto de atención sobre la evolución poblacional de estas dos especies bajo las dosis más bajas de radiación empleadas, donde la tendencia de las curvas muestran un mayor crecimiento que en el cultivo control, lo que indica que debió producirse una **radioestimulación del crecimiento**.

La mayor radiorresistencia en esta primera fase del estudio lo ha mostrado *Microcystis aeruginosa*. Bajo todas las dosis empleadas se registró crecimiento, aunque a partir de 500 Gy la velocidad de crecimiento disminuye (a esta dosis y tras 24 horas se obtuvo un valor de  $r = 22,19\%$  y de un  $r = 8,64\%$  tras cuatro días postirradiación).

Los estudios de Zheng *et al.* (2012) coinciden con nuestros resultados: Dicha microalga es peligrosa, puesto que contamina el agua de bebida. Desarrollaron un procedimiento para su eliminación irradiando el agua con irradiación gamma para hacerla potable. Pero tuvieron que llegar a dosis de hasta 9000 Gy para exterminar el 98% de estas microalgas y solo lo lograron al quinto día postratamiento.

Un estudio al Microscopio Electrónico de Rastreo (SEM) indicó que, a nivel molecular, además de lesiones en el núcleo, la radiación afectaba preferentemente al complejo fotosintético a través de la rápida disminución de los pigmentos fotosintéticos (carotenoides y ficocianina) cuya concentración decrecía proporcionalmente al incremento de dosis de radiación gamma administrada. Inversamente, la peroxidación

lipídica en las células de *Microcystis aeruginosa* aumentaba con la dosis de irradiación administrada.

El análisis de las curvas de crecimiento a cualquier dosis para *Emiliania huxleyi* indican la notable radiosensibilidad de esta microalga. *Tetraselmis suecica* por su parte muestra que, tanto el control como la población sometida a 50 Gy parecen crecer paralelamente. Tras 24 horas y a dosis de 100 Gy comienza a disminuir claramente el crecimiento (para *T. suecica* y un  $t=4$  se obtuvo un valor de  $r = -9,54\%$ ), al igual que ocurre a las dosis de 500 (para  $t=4$ ,  $r = -19,50\%$ ) y 1000 Gy ( $r = -19,13\%$  para  $t=4$ ). Nos llamó mucho la atención el evidente cambio de forma sufrido por esta microalga. Desde las 24 horas y a dosis de 1000 Gy de irradiación, y durante las posteriores tres semanas de seguimiento, apreciamos una evolución morfológica desde su típica apariencia arriñonadas hasta formas esféricas muy dilatadas e irregulares. Este comportamiento ya fue señalado en los primeros estudio con el *G. Chlorella* realizados por Posner (1965). Dicho autor aplicó una exposición de 72 Gy/día de forma continua durante tres días, tras la cual observó una reducción en el número de divisiones y un aumento del volumen celular (tal y como se observó en *Nitzschia closterium* y en *Tetraselmis suecica* en esta primera fase del experimento), a la vez que una disminución en el contenido de RNA (sin que se observasen cambios en los niveles de proteínas y DNA). Según Posner, si esta reducción en el crecimiento poblacional se debiese a un mecanismo de bloqueo de la división se encontraría una duplicación del material nuclear, pero lo más probable es que se deba a un incremento del contenido acuoso del citoplasma en respuesta a daños en la membrana celular.

La bajísima densidad a que la población de *Prorocentrum lima* satura *in vitro* impidió realizar las curvas de crecimiento/dosis de radiación aplicadas en los casos anteriores y únicamente se pudo estimar tentativamente la supervivencia a partir de la conservación o no de su morfología celular. Si bien el control mostró un ligero crecimiento poblacional (del 52,84% inicialmente a un 63,93% tras 96 horas postirradiación), a dosis de 250 Gy la reproducción se vio algo disminuída (del 51,85% inicial a un 46% tras cuatro días). Fue bajo la dosis de 1000 Gy cuando estimamos que comenza a disminuir claramente la población (del 55,36% horas de células morfológicamente intactas a las cero horas a un 37% tras 96 horas). Destacar también que los cambios morfológicos se observaron a partir de las 72 horas y a 250 Gy, los cuales se basaron en la existencia de una gran vacuola situada muy cerca del núcleo en posición opuesta a la zona flagelar.

No conocemos las razones que expliquen estas acusadas diferencias en radiosensibilidad entre estas seis microalgas. Una hipótesis sería considerar que responden a las circunstancias evolutivas por las que han tenido que pasar estos organismos y a las exigencias consiguientes de su adaptación al medio.

• **Segunda Fase.** Esta segunda fase experimental se basó en una comparación de la radioresistencia entre organismos adaptados a condiciones crónicas de radiación alfa (uranio) y líneas similares procedentes de colección y, por tanto, no expuestas a tipo alguno de radiación. Debo decir que este estudio ha sido posible gracias al equipo de E. Costas Costas, quienes aislaron de los residuos acuosos de una mina de uranio en Salamanca las especies *Chlamydomonas fonticola*, *Dictyosphaerium ehrenbergianum*, *Scenedesmus obtusus* y *Pleurosigma acuminatum* tras haber muestreado sus aguas. Se pretendió verificar si dicha exposición crónica a radiación alfa les ha conferido una mayor radioresistencia frente a las radiaciones gamma (ionizantes).

En primer lugar creo necesario resaltar las **condiciones extremas y teóricamente inviábiles del medioambiente de las pozas de Saelices** de donde se obtuvieron los dos microorganismos empleados en nuestro estudio (*Chlamydomonas fonticola* y *Dictyosphaerium ehrenbergianum*). La concentración de uranio en las aguas naturales suele mantenerse por debajo de 1 µg/L (Tsezos y Volesky, 1982), e incluso en la proximidad de las minas de este metal no suele subir de 3,5 mg/L (Dessouki *et al.*, 2005). Con respecto a la normativa vigente sobre la concentración límite establecida para el uranio, Mill Tailings Remediation Action (UMTRA), en los Estados Unidos se sitúa en 0,05 mg/L (Anderson *et al.*, 2003). Si comparamos este valor con la alta concentración de uranio presente en Saelices (25 mg/L), podemos considerar que estos bancos de agua constituyen un medioambiente extremo. Además, el análisis de estas aguas para otros metales reveló las siguientes concentraciones de Cu (0,86 mg/L), Zn (17,8 mg/L), Pb (5,58 µg/L) y As (155 µg/L). La elevada toxicidad del uranio en estas aguas residuales procedente de la minería, a nivel biológico, quedó demostrada cuando se aplicó el test toxicológico Microtox® (Costas *et al.*, 2008), el cual se emplea para comprobar la inhibición de un determinado medio al crecimiento celular.

Debido a que las diferencias más claras entre la radioresistencia mostrada por *Chlamydomonas fonticola* y *Dictyosphaerium ehrenbergianum* (ambas captadoras de uranio), procedentes de Saelices y sus halotipos más parecidos existentes en colección se observaron a dosis altas y a tiempos largos, y a fin de realizar una análisis comparativo lo más esclarecedor posible, se discute a continuación las curvas de crecimiento e imágenes obtenidas de las dosis de 500 y 1000 Gy.

#### ♦ *Chlamydomonas fonticola* (Saelices) vs *Chlamydomonas reinhardtii* (colección)

En ambos casos el control mostró el crecimiento (exponencial) esperado.

En cuanto a las curvas correspondientes a 500 y 1000 Gy cabe decir que *Chlamydomonas fonticola* mantuvo una discreta tendencia al alza en el crecimiento (los valores de *r* a 500 Gy para los seis puntos medidos fueron respectivamente; -37,86%, -29,01%, -9,64%, 15,53%, 5,68% y 4,14%; para dosis de 1000 Gy los valores obtenidos fueron de 75,52%, 26,05%, 21,04%, 24,15%, 7,79% y 4,04 %), mientras que *Chlamydomonas reinhardtii* mostró un descenso (para 500 Gy se obtuvieron los siguientes valores de *r*: 24,90%, 3,64%, 9,62%, 9,42%, -2,22% y -14,51% y para dosis de 1000 Gy: 34,43%, 17,67%, 14,12%, 5,62%, -4,22% y -16,73%). De hecho, tras 10 días la tasa de células morfológicamente intactas en el caso de *Chlamydomonas fonticola* fue de un 70 % (por contaje directo) a la dosis de 500 Gy y de un 55% a 1000 Gy. Los valores obtenidos para *Chlamydomonas reinhardtii* fueron de un 40% para la dosis de 500 Gy y un 8% para la dosis de 1000 Gy. El deterioro es claramente mayor en *Chlamydomonas reinhardtii* que en *Chlamydomonas fonticola* a los 19 días postirradiación; así, en la línea de colección la mayoría de las estructuras visibles eran células en estado de lisis o bien agrupaciones de entre cinco y diez células.

En cuanto a la movilidad celular, y como ya se comentó, se observó una disminución en relación al incremento de dosis y de días transcurridos para *Chlamydomonas fonticola* (tras 240 horas aún había un 1-2% de movilidad). Por el contrario *Chlamydomonas reinhardtii* se mostró mucho más sensibles con una movilidad que descendió drásticamente en el cultivo de 1000 Gy a partir del segundo día y en el de 500 Gy a partir del cuarto.

Por tanto, **todos estos datos apuntan claramente a que *Chlamydomonas fonticola* es más radioresistente que *Chlamydomonas reinhardtii*.**

♦ *Dictyosphaerium ehrenbergianum* (Saelices) vs *Dictyosphaerium chlorelloides* (colección)

Como en el caso anterior, los controles mostraron el esperado crecimiento progresivo. Comparando la gráfica de 500 Gy para *Dictyosphaerium ehrenbergianum* y *Dictyosphaerium chlorelloides* se observa en la primera una tendencia al crecimiento más pronunciada (los valores de  $r$  en los seis puntos de medida para *Dictyosphaerium ehrenbergianum* fueron: -19,20%, -0,48%, 0,64%, 19,64%, 9,64%, 9,83% y 8,93%. Los valores de  $r$  obtenidos para *Dictyosphaerium chlorelloides* fueron: 34,83%, 1,63%, -1,41%, 11,22%, 6,72% y 5,39%). En 1000 Gy el descenso es más acusado en *Dictyosphaerium chlorelloides* (los valores de  $r$  para la línea de Saelices a esta dosis fueron de: -7,92%, -14,16%, 24,06%, 15,82%, 5,36% y 3,41%. Los valores de  $r$  obtenidos para la línea de colección fueron: -9,93%, -7,23%, -5,60%, -2,80%, -5,71% y -9,47%).

En cuanto a la morfología celular (tras 240 horas postirradiación) de *Dictyosphaerium ehrenbergianum* pudo apreciarse una clara diferencia entre el cultivo sometido a 500 y el sometido a 1000 Gy, pues en el primero de ellos había aproximadamente un 60% de células intactas y en el segundo un 40%. Para *Dictyosphaerium chlorelloides* las cifras fueron de un 30% a 500 Gy y a 1000 Gy la cantidad de células morfológicamente intactas disminuyó apreciablemente, hasta un 10%.

Con todo esto podemos decir **que *Dictyosphaerium ehrenbergianum* también mostró más radioresistencia que *Dictyosphaerium chlorelloides*.**

Además, la comparación de la evolución (poblacional) temporal y morfológica entre los *G. Chlamydomonas* y *Dictyosphaerium* de Saelices indica que: a dosis de 500 Gy *Chlamydomonas fonticola* muestra una recuperación anterior (48 horas) a la mostrada por *Dictyosphaerium ehrenbergianum* (72 horas). Además, tras 1000 Gy, la primera de ellas presenta un decrecimiento claro en la población a partir de las 96 horas y la segunda ya a las 72 horas. Se concluye así que el ***G. Chlamydomonas* es más radioresistente que el *G. Dictyosphaerium*.**

Comparando nuestros resultados del primer experimento con los obtenidos en un trabajo llevado a cabo por el Consejo de Seguridad Nuclear con el *G. Chlorella* y exposiciones de radiación gamma a dosis similares (Martínez y Fernández, 1983), los autores encontraron que la radiosensibilidad de *Chlorella pyrenoidosa* a la radiación gamma del  $^{60}\text{Co}$  se registra mayoritariamente a las 96 horas entre las dosis de 100 y 500 Gy. Sin embargo, nosotros observamos que el bloqueo del crecimiento solo parecía iniciarse en *Dictyosphaerium chlorelloides* a 500 Gy y tras 240 horas postirradiación. Por su parte las líneas radioresistentes de Saelices solo comenzaron a declinar a las 72 horas y 1000 Gy para *Dictyosphaerium ehrenbergianum* y a las 96 horas para *Chlamydomonas fonticola* a la misma dosis.

El significado obvio de este resultado es que a dosis altas de radiación, el proceso de división celular resulta afectado. Igualmente, el tiempo de latencia entre la aplicación de la radiación gamma y la detención del crecimiento se hace más corto a medida que se incrementa la dosis. Es interesante señalar que Martínez y Fernández (1983) no observaron modificación alguna en el contenido total de proteínas o en el conjunto de aminoácidos totales, lo que confirma una vez más que las lesiones radioinducidas, incluso a dosis altísimas como a 1000 y 5000 Gy, afectan mayormente a la célula cuando ocurren preferentemente en el material genético nuclear.

No es muy abundante la bibliografía sobre radioresistencia en el *G. Chlorella*, *G. Chlamydomonas* y demás microalgas y la existente data de los años 70 y 80 del siglo XX: Kunz (1972), tras sincronizar *Chlorella sorokiniana* mediante un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y tras exponerla a 100 Gy ( $^{60}\text{Co}$ ), observó que esta alga presentaba la mayor radiosensibilidad durante la fase de síntesis de DNA en el cloroplasto.

Los efectos de la radiación gamma en el *G. Chlorella*, referidos a la síntesis de DNA, RNA y proteínas, dependen básicamente de las dosis empleadas. Posner (1965) expuso esta microalga a 72 Gy/día de forma continua, durante tres días. Vio una reducción del número de divisiones y un aumento del volumen celular, a la vez que una reducción en el contenido de RNA, sin que se observasen cambios en el contenido proteico y de DNA.

Un estudio interesante es el realizado por Hampl *et al.* (1971) quienes estudiaron la capacidad de recuperación, en distintos puntos del ciclo celular, de *Chlorella pyrenoidosa* frente a varias dosis de radiación gamma. En este caso, la mayor radiosensibilidad de las células apareció justo antes de la fase de la síntesis del DNA mientras que la fase de esporulación mostró la mayor capacidad de recuperación. Además, los efectos de la irradiación varían también dependiendo de que ésta se administre de forma aguda o crónica (que la dosis sea continua o se fraccione en dos o más veces modifica el efecto final producido). Así, los estudios de Kunz (1972) con *Chlorella sorokiniana* muestran cómo al fraccionar una dosis de 100 Gy en dos veces aparece en la curva de supervivencia, tras la segunda irradiación, un hombro típico que indica la capacidad de recuperación del daño subletal sufrido después de la primera irradiación.

En nuestro estudio hemos observado que tanto *Chlamydomonas fonticola* como *Dictyosphaerium ehrenbergianum* mostraron mayor supervivencia a la radiación que los halotipos más parecidos existentes en cultivos de colección, lo que interpretamos como una radioresistencia adquirida paulatinamente. Puede tratarse, muy probablemente, de otro mecanismo más de adaptación que ambas líneas debieron desarrollar a lo largo de los 52 años de exposición a la radiación. Dicha argumentación se ve apoyada por los datos obtenidos tras analizar la naturaleza de la biomasa en estas pozas de minería de uranio, en las que de las cuatro especies supervivientes encontradas (*Chlamydomonas fonticola*, *Dictyosphaerium ehrenbergianum*, *Scenedesmus obtusus* y *Pleurosigma acuminatum*), la primera de ellas, la más radioresistente según nuestro estudio, representó la casi totalidad de la materia viva existente en ese ecosistema.

**La reparación de lesiones subletales postirradiación** es un factor muy importante para que una gran variedad de tipos celulares sometidos a irradiación puedan sobrevivir. Sin embargo, los primeros estudios de radioreparación no llegaron hasta comienzos de los años 50 del pasado siglo de la mano de Jacobson (1957) empleando el *G. Chlamydomonas* y en células de mamíferos dos años después (Elkind y Sutton, 1959) y es escasísimo el número de estudios posteriores que emplean microalgas como material de investigación. Tenemos que remontarnos hasta 1980 para encontrar el siguiente avance en este campo. Nelson *et al.* (1980) estudiaron, empleando *Chlamydomonas reinhardtii*, exposiciones a electrones rápidos aplicando dos dosis iguales de 100 krad/minuto separadas por un intervalo de 15 segundos y comprobaron la existencia de al menos dos procesos de reparación independientes. Cada uno de éstos se mostró autónomo con respecto al otro y reparó un tipo de daño subletal diferente. El proceso rápido se desarrolló entre 2 y 4 minutos, mientras que el más lento (consistente en el

tipo Elkind-Sutton) no ocurrió hasta pasados 20–30 minutos de producirse las lesiones radioinducidas

Eran tiempos previos a la Biología Molecular y por ello Nelson y su equipo se basaron en algoritmos aplicados al crecimiento celular para obtener sus conclusiones. Por tanto, se trató de un avance pionero que conduciría años después a los conocidos sistemas de reparación en eucariotas identificados gracias a nuestra actual batería de métodos moleculares. Se trata de procesos enzimáticos que se complementan entre sí y cuyo mecanismo y velocidad de reparación son dependientes del tipo de lesión (cadena simple, doble cadena, etc.) formando un todo a nivel de metabolismo nuclear. Es sorprendente que aún hoy en día no se encuentre en la bibliografía estudios recientes sobre este campo aplicado a microalgas.

**Radioestimulación.** A dosis de 50 Gy *Dictyosphaerium chlorelloides*, *Dictyosphaerium ehrenbergianum* y *Nitzschia closterium* mostraron una curva de estimulación del crecimiento poblacional.

Otro ejemplo que indica el papel estimulante de la radiación gamma a dosis bajas es el interesante resultado que Zheng *et al.* (2012) obtuvieron en *Microcystis aeruginosa*. Encontraron, empleando rayos gamma, que la administración de dosis bajas incrementaba la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y de la peroxidasa (POD). Y, como era de esperar, conforme incrementaron la radiación la actividad de SOD y POD decrecía.

La radioestimulación es un campo que se inició en los años sesenta: Martínez y Fernández (1983) vieron que dosis de 10 Gy sobre *Chlorella pyrenoidosa* producía una estimulación del crecimiento de los cultivos que (a excepción del valor correspondiente a las 24 horas) presentan valores medios poblacionales superiores a los del testigo. Kúzin y Angelova-Patarinska (1970) encontraron que a dosis entre los 2 y 10 Gy incrementaba el crecimiento de colonias de levadura irradiadas. Seuberling (1970) observó un aumento del 20% en el número de células en cultivos de *Euglena gracilis*, irradiadas a dosis entre 0,5-1 Gy. Así mismo, Gileva *et al.* (1977) encontraron estimulación irradiando cultivos de *Chlorella vulgaris* con dosis entre 5 y 10 Gy de radiación gamma. En líquenes, Gannutz (1972), concretamente en *Cladonia cristaeella*, encontró un aumento del crecimiento, medido como peso seco durante los 60 días después de la irradiación, con dosis de 50 Gy. En plantas superiores también se ha descrito este fenómeno.

En la época en la que se realizaron estos estudios no existían datos concluyentes que explicasen de manera clara este fenómeno de radioestimulación para dosis bajas. Se propuso que su efecto dependía de varios factores como; la radioresistencia del organismo a estudio, el tipo de radiación empleada y el flujo al cual se administraba la dosis.

Tomando como base los estudios descritos anteriormente en organismos unicelulares (así como en semillas de plantas), pronto surgieron investigadores que intentaron comprobar los resultados obtenidos por aquellos empleando ahora células de eucariotas superiores y células humanas. A tal efecto utilizaron dosis y tiempos de radiación proporcionales a la radioresistencia (muy inferior en comparación con las microalgas) de estas líneas celulares.

Así, más recientemente, Wang y Cai (2000) irradiando con 0,5 Gy lograron estimular la proliferación de células hematopoyéticas en ratones y poder así explorar las rutas de señalización celular implicadas en esta radioestimulación. Identificaron la ruta de las MAPKs (proteín quinasas activadas por mitógenos), familia de kinasas serina/threonina que median la traducción de señales desde la superficie celular hasta el núcleo. Suzuki

*et al.* (2001) irradiaron células humanas diploides normales a dosis entre 0,02 y 0,05 Gy y registraron también una proliferación estimulada por la activación de la ruta MAPKs. En un intento de comprobar el papel de estas rutas en la radioestimulación, Soon *et al.* (2007) examinaron el efecto de 0,05 Gy en una línea celular derivada de fibroblastos humanos de origen pulmonar (células CCD 18 Lu) y observaron proliferación celular. La activación de la ruta de las MAPKs se determinó mediante Western blot y se empleó el sistema siRNA (RNA pequeño de interferencia) para inhibir la expresión de ERK1/2 y p38. Se comprobó que la radiación recibida activó ERK1/2 y p38, pero no activó JNK1/2. Asimismo, un inhibidor específico de ERK1/2, el U0126, disminuyó la fosforilación de las proteínas ERK1/2 y un efecto supresor similar fue observado con un inhibidor de p38, el PD169316. La supresión de la fosforilación de ERK1/2 y p38 con estos inhibidores hizo decrecer la proliferación celular. Por tanto, empleando siRNA se vio que ERK1/2 y p38 bloquearon la proliferación celular. En conjunto, estos resultados sugieren que dosis de 0,05 Gy de radiaciones ionizantes incrementan la proliferación celular mediante la activación de ERK1/2 y p38 en células humanas *in vitro*.

Partiendo de estas y otras observaciones se ha llegado a un nuevo concepto en radiobiología denominado **Hormesis**. En contra de la hipótesis clásica de una relación lineal entre dosis de radiación recibida, aumento de lesiones y supresión del crecimiento celular, la hormesis demuestra que una dosis baja estimula el crecimiento y mejora los sistemas endógenos de reparación, protegiendo a la célula de posteriores daños en el DNA (Duport, 2003) (Calabrese, 2004).

Volviendo a los eucariotas unicelulares, el caso más asombroso de radioestimulación lo protagonizan los hongos denominados **Radiotrópicos**, descubiertos en 2007 en el interior de la planta de energía nuclear de Chernobyl. Éstos son capaces de emplear su melanina para convertir la radiación gamma en energía química para su crecimiento. Así, *Cladosporium sphaerospermum*, *Wangiella dermatitidis* y *Cryptococcus neoformans*, incrementaron su biomasa en un medioambiente de radiación 500 veces superior a lo normal. Al parecer, la energía radiactiva altera las propiedades químicas de la melanina aumentando los niveles de transferencia de electrones 3-4 veces más de lo usual a través de la reducción del ferrocianuro mediante la NADH. Un mecanismo quizás paralelo a la ruta multipaso de la fotosíntesis (Dadachova *et al.*, 2007).

Es conveniente tratar a continuación sobre varios aspectos significativos de la biología de estas microalgas radioresistentes de Saelices de cara a diseñar futuras líneas de investigación generadas a partir de nuestros resultados.

**A) ¿Qué mecanismos de defensa han desarrollado las microalgas de Saelices contra la toxicidad por irradiación y metales pesados?** Los estudios bioquímicos, las imágenes ultraestructurales y los análisis aplicando el sistema ICP-MS (análisis de rayos X al microscopio electrónico) demostraron que estas microalgas desarrollaron dos estrategias para evitar el efecto tóxico y radiactivo de los diversos metales pesados existentes en su ecosistema. Partiendo de la especie *Chlamydomonas fonticola* obtenida de Saelices, el grupo de García-Balboa *et al.* (2013) lograron una cepa mejorada genéticamente mediante selección artificial, llamada *Chlamydomonas ChlSPG1359*. Ésta cepa mejorada primeramente forma una barrera en la pared celular que bloquea la penetración del uranio al interior (90% del radionúclido captado: 103 mg uranio/g peso seco). Cuando a pesar de ello penetra, *Chlamydomonas* lo secuestra en formas no-

tóxicas mediante su internalización en liposomas o mediante asociación con proteínas (“exclusión metálica”) que se ligan al metal por bioacumulación (12 mg uranio/g peso seco) dentro de la célula (Simon *et al.*, 2011), limitando la peligrosidad de estos iones tóxicos una vez que están dentro de la célula (Perales-Vela *et al.*, 2006).

Esta capacidad natural de concentrar uranio ya fue sugerida por Lovelock (1988) como explicación a la presencia de microalgas tras 2 m.a de contaminación en Oklo (minas de uranio en Gabon, Africa). En este sentido se ha publicado que ciertas especies de cianobacterias y microalgas son capaces de secuestrar (bioadsorber) este radionúclido en su membrana externa (Acharya *et al.*, 2009) (Acharya *et al.*, 2012) (Fortin *et al.*, 2004) (Fortin *et al.*, 2007) (Cecal *et al.*, 2012), y también bioacumularlo en su interior por un mecanismo activo basado en cierta actividad metabólica (Vogel *et al.*, 2010).

**B) Biorremediación.** Recientemente se ha aprovechado y optimizado esta capacidad natural de *Chamydomonas ChlSPGI359* para la captación masiva de uranio cara a su aplicabilidad como biorremediador de contaminación medioambiental por este metal. Partiendo de que muchos organismos son capaces de interactuar con el uranio mediante diversos mecanismos y de las consecuencias de la contaminación por este metal, el grupo del Departamento de genética y Producción animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense vislumbró la posibilidad de utilizar la línea *Chamydomonas* aislada de Saelices para intentar extraer dicho radionúclido como biorremediador de un ecosistema. Sometieron este organismos a un protocolo de mejora genética en tres pasos: 1) identificación de las variaciones genéticas; 2) cultivo y selección artificial y 3) evaluación de la respuesta obtenida a la selección *versus* respuesta máxima teórica. Este proceso de mejora incrementó la capacidad de toda el alga para recuperar uranio hasta 115 mg uranio/g peso seco, un aumento de casi cuatro veces en comparación con la línea original de Saelices (32 mg uranio/g peso seco) (García-Balboa *et al.*, en prensa).

**C) Su capacidad extraordinaria de adaptación.** En contraste con la idea clásica de que la adaptación a medioambientes extremos solo puede darse lentamente a lo largo de miles de años mediante selección gradual de varias mutaciones con efectos menores (Gould, 2002) tal como postula el axioma de Charles Darwin “*natura non facit saltum*”, la adaptación de estas microalgas de Saelices y Villavieja ocurrió muy rápidamente, tan solo en 52 años. Así pues, representan un asombroso ejemplo de rápida adaptación a toxicidad extrema. Dicha adaptación debió de ser muy costosa, tal y como se deduce por el pequeño número de especies que lo han logrado; Las concentraciones celulares para Saelices y Villavieja respectivamente son: *Chlamydomonas fonticola* 2200 cls/ml y 700 cls/ml, *Dictyosphaerium ehrenbergianum* 800 cls/ml y 220 cls/ml, *Scenedesmus obtusus* 300 cls/ml y 0 cls/ml y *Pleurosigma acuminatum* 500 cls/ml y 0 cls/ml. Esta bajísima diversidad de fitoplancton contrasta con la alta variedad normalmente observada en pozas no contaminadas (pozas de Zamorra, Salamanca).

Sin embargo, Saelices no es el único ejemplo. Cada vez se publican más estudios que demuestran la capacidad de las microalgas a sobrevivir en medioambientes extremos mediante la selección de mutaciones espontáneas (que confieren resistencia) que solo afectan a un gen. Mediante estos mecanismos las microalgas son capaces de adaptarse a antibióticos y herbicidas (Sager *et al.*, 1977) (Sager, 1985) (Costas *et al.*, 2001) (López-Rodas *et al.*, 2007) (Marvá *et al.*, 2010) (González *et al.*, 2012), algacidas (García Villada *et al.*, 2004) (Costas *et al.*, 2013), xenobióticos (García-Villada *et al.*, 2002), ácidos tóxicos provenientes de derrames de minas (Baos *et al.*, 2002) (López-Rodas *et*

al., 2001) (López-Rodas *et al.*, 2008a) (López-Rodas *et al.*, 2008b) y efluentes volcánicos y aguas termales (López-Rodas *et al.*, 2009) (Costas *et al.*, 2008).

Pero en Saelices y Villavieja, las altas concentraciones de uranio, la presencia de otros metales pesados y la acidez, sugieren que ha existido un estrés ambiental más severo que en otros medioambientes donde el ajuste solo requiere una única mutación. La recombinación durante la reproducción sexual permitiría que dos mutaciones de diferentes microalgas apareciesen juntas en la misma célula. Esta célula recombinante con ambas mutaciones (preselectivas) podría soportar el efecto tóxico de las aguas de Saelices. Esta adaptación es un excelente ejemplo de la ventaja que confieren los intercambios genéticos recíprocos por recombinación. Es más, las algas clorófitas (División Chlorophyta) parecen ser especialmente capaces de lograr una adaptación más rápida que otras microalgas en varios medioambientes extremos tales como el río Aguas Agrias (López-Rodas *et al.*, 2008a), Mynydd Parys (López-Rodas *et al.*, 2008b), río Tinto (Costas *et al.*, 2007), el lago Agrio y el río Caviahue (López-Rodas *et al.*, 2011), aunque la razón de esta diferencia permanece desconocida.

Generalizando, cabría deducir que el mecanismo antes propuesto para las microalgas de Saelices y Villavieja podría extrapolarse para explicar la supervivencia y adaptación de otras poblaciones de microalgas que habitan en condiciones extremas en diversos lugares del planeta, las cuales quizás procederían de mutantes preselectivos “afortunados” que confirieron valores adaptativos significativos y en períodos muy cortos de tiempo. Ello aporta esperanza para presuponer que puedan darse algunas recuperaciones evolutivas de poblaciones confrontadas con cambios medioambientales rápidos (cambio climático).

**D) Radioresistencia adquirida.** A los tres aspectos citados para *Chlamydomonas fonticola* y *Dictyosphaerium ehrenbergianum* se suma ahora nuestros resultados, que demuestran la elevada radioresistencia de estas microalgas, capacidad que debieron adquirir durante sus años de exposición (y no antes) a las elevadas concentraciones de uranio. Además, la radioresistencia que muestran estas microalgas es mayor que la mostrada por los halotipos más parecidos existentes en cultivos de colección. Comparando *Chlamydomonas fonticola* y *Dictyosphaerium ehrenbergianum*, hemos comprobado que la primera de ellas es la más radioresistente. ¿Sería esta propiedad la que le ha permitido a *Chlamydomonas fonticola* progresar con mayor facilidad que las otras tres especies supervivientes (*Dictyosphaerium ehrenbergianum*, *Scenedesmus obtusus* y *Pleurosigma acuminatum*) pasando a constituir el 90% de la biomasa fitoplanctónica total (García-Balboa *et al.*, 2013) existente en estas charcas radiactivas?

## CONSIDERACIONES FINALES

A través de la fotosíntesis el fitoplancton ha producido hasta fechas no muy lejanas casi el 50% del oxígeno atmosférico de la tierra. Lo realizaba a través de la “bomba biológica” que fijaba cien millones de toneladas de dióxido de carbono al día (Falkowski y Raven, 1997) (Schiermeier, 2010). Pero la industrialización de la sociedad y la explosión demográfica del último siglo están generando una producción exponencial de materiales de deshecho generando, como consecuencia, graves problemas de contaminación y los subsecuentes desastres ambientales, modificando la ecología global y provocando devastadoras consecuencias evolutivas (Palumbi, 2001). A este respecto cabe decir que la cantidad de fitoplancton existente en la Tierra ha decrecido desde 1950 (Boyce *et al.*, 2010) (Behrenfeld *et al.*, 2006). Las mediciones al

respecto indican que la proporción de biomasa de microalgas aparentemente ha decrecido al 40% muy probablemente como consecuencia del cambio climático global. (Boyce *et al.*, 2010). Por tanto, sólo las especies que se adapten a estos cambios sobrevivirán.

Así, es muy importante conocer los comportamientos biológicos de las microalgas en diferentes condiciones físico-químicas, tanto naturales como experimentales, reconocer los mecanismos y cuantificar sus extraordinarias capacidades adaptativas a fin de evaluar (extrapolar) el papel que, sin duda, acabarán jugando en la futura biomasa terrestre sometida a un creciente estrés debido al cambio global (ya que el fitoplancton posee una gran plasticidad para la adaptación).

## CONCLUSIONES

1-La capacidad de radioresistencia de las microalgas en general mostró ser muy superior a la referenciada para cualquier célula de mamífero (DL50=3 Gy en piel y 1 Gy para linfocitos humanos).

2-Comparando microalgas procedentes de diversas especies (filogenéticamente diferentes) (*Dictyosphaerium chlorelloides*, *Microcystis aeruginosa*, *Prorocentrum lima*, *Nitzschia closterium*, *Emiliana Huxleyi* y *Tetraselmis suecica*), se ha identificado una respuesta drásticamente distinta frente a dosis agudas de radiaciones gamma, siendo *Microcystis aeruginosa* (de agua continental), la más radioresistente (mostrando tasas de crecimiento siempre al alza independientemente de la dosis de radiación recibida) y *Emiliana Huxleyi* (microorganismo oceánico) la que sufrió más daños irreparables incluso a dosis comparativamente más bajas (50 Gy y 24 horas postirradiación).

3-*Chlamydomonas fonticola* y *Dictyosphaerium ehrenbergianum* (ambas captadoras de uranio) fueron más radioresistentes que sus halotipos más parecidos de colección (*Chlamydomonas reinhardtii* y *Dictyosphaerium chlorelloides*) y, por tanto, no adaptadas al medioambiente extremo de las charcas mineras de Saelices. Este resultado sugiere que su proceso adaptativo les ha conferido mecanismos moleculares más eficientes frente a diferentes modalidades de radiación.

4- *Chlamydomonas fonticola* ha sido, comparativamente a *Dictyosphaerium ehrenbergianum* más radioresistente, ya que la primera mostró una mejor capacidad de crecimiento y menores cambios morfológicos, deduciéndose de ello que ha desarrollado sistemas antiirradiación cuya existencia es concordante con su capacidad posteriormente demostrada como agente biorremediador tras su mejora *in vitro*.

5-Se detectó un efecto hormético radioestimulante tras la exposición a 50 Gy en *Dictyosphaerium chlorelloides*, *Dictyosphaerium ehrenbergianum* y *Nitzschia closterium*. Se confirman así los recientes hallazgos en otros organismos, corrigiendo el clásico Modelo Lineal Sin Umbral para daño por radiaciones.

## **FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN**

A) Nos preguntamos; ¿Las microalgas radioresistentes de Saelices y Villavieja deben su habilidad únicamente a dos mutaciones y a la reproducción sexual, que además les confiere la capacidad de capturar uranio y neutralizarlo? ¿O bien han desarrollado además algún nuevo o más eficaz sistema de radioresistencia que les ha permitido adaptarse tan rápidamente? En este sentido, un futuro diseño experimental consistiría en cuantificar las distintas enzimas reparadoras del DNA y sus rutas metabólicas.

a) Exponiéndolas a radiaciones de baja intensidad y cuantificando las diferencias (en cantidad y tiempo) entre los sistemas enzimáticos reparadores implicados.

b) Y comparando a varios niveles estas dos líneas con las de colección.

Es decir, ¿se han transformado en microalgas supercaptadoras de uranio o bien en superreparadoras? ¿O en ambas?

Esta última hipótesis puede apoyarse en los datos existentes en la literatura sobre el incremento en la radioresistencia generada bajo dosis crónicas de radiación, en levaduras, bacterias, protozoos, algas, plantas e insectos (Joiner, 1994).

B) Otra línea abierta consiste en el estudio ultraestructural. Partiendo del material fijado para microscopía electrónica, podemos realizar análisis estereológicos midiendo los cambios en los orgánulos, en la distribución del uranio en la célula, cambios de volúmenes, etc. Es decir, cuantificar las alteraciones ya observadas morfológicamente de un modo simplemente visual e intentar correlacionarlas con las tasas de crecimiento obtenidas en nuestro estudio.

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi agradecimiento a la Fundación Centro Oncológico de Galicia “José Antonio Quiroga y Piñeyro” por la facilidad dada para la utilización de la Bomba de Cobalto y al personal de radiofísica y radioterapia por su dedicación, al igual que al Dr. José Luís Fernández, Jefe de Genética de este centro, por permitirme el uso de las instalaciones del laboratorio. También agradecer al CIEMAT y a la Universidad Complutense de Madrid, en especial al Departamento de Genética y Producción Animal de la Facultad de Veterinaria por permitirme trabajar con todas estas líneas de microalgas y por su continuo asesoramiento.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acharya, C., Chandwadka, P., Apte, S.K. (2012) Interaction of uranium with a 396 filamentous, heterocystous, nitrogen-fixing cyanobacterium, *Anabaena torulosa*. *Bioresour Technology* 116, 290-294.
- Acharya, C., Joseph, D., Apte, S.K. (2009) Uranium sequestration 398 by marine cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* strain BDU/75042. *Bioresour Technology* 100, 2176–2181.
- Anderson, R.T., Vrionis, H.A., Ortiz-Bernad, I., Resch, C.T., Long, P.E., Dayvault, R., Karp, K., Marutzky, S., Metzler, D.R., Peacock, A., White, D.C., Lowe, M., Lovley, D.R. (2003) Stimulating the in situ activity of *Geobacter* species to remove Uranium from the groundwater of a Uranium-contaminates aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5884–5891.
- Amaral-Zettler, L.A., Gómez, F., Zettler, E., Keenan, B.G., Amils, R., Sogin, M.L. (2002) Eukaryotic diversity in Spain's River of Fire. *Nature* 417, 137.
- Baos, R., Garcia-Villada, L., Agrelo, M., López Rodas, V., Hiraldo, F., Costas, E. (2002) Short Term adaptation of microalgae in highly stressful environments: an experimental model analysing the resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the heavy metals mixture from the Aznalcollar mine spill. *European Journal of Phycology* 37, 593–600.
- Barendsen, G. W., Broerse, J.J. (1970) Experimental radiotherapy of rat rhabdomyosarcoma with 15 mev neutrons and 300 Kv x-rays. II Effects of fractionated treatments applied five times a week for several weeks. *European Journal of Cancer* 6, 89.
- Barreno, P.G. (2009) Maquinaria de reparación del ADN. *Anales Real Academia Nacional de Farmacia*.
- Behrenfeld, M.J., O'Malley, R.T., Siege, D.A., McClain, C.R., Sarmiento, J.L., Feldman, G. C., Milligan, A.J., Falkowski, P.G., Letelier, R.M., Boss, E.S. (2006) Climate-driven trends in contemporary ocean productivity. *Nature* 444, 752–755.
- Bergonie, J. and Tribondeau, L. (1959) Interpretation of some results of radiotherapy and an attempt at determining a logical technique of treatment. *Radiation Research* 11:587, (translation of original article in *C.R. Academie of Sciences* 143, 983, 1906).
- Boyce, D., Lewis, M., Worm, B. (2010) Global phytoplankton decline over the past century. *Nature* 466, 591–596.
- Calabrese, E. J. (2004) Hormesis: from marginalization to mainstream: A case for hormesis as the default dose-response model in risk assessment. *Toxicology and Applied Pharmacology* 197, 125–136.
- Cecal, A., Humelnicu, D., Rudic, V., Cepoi, L., Ganju, D., Cojocari, A. (2012) Uptake of uranium ions from uranium ores and sludge by means of *Spirulina platensis*, *Porphyridium cruentum* and *Nostok linckia* alga. *Bioresour Technology* 118, 19-23.
- Clinton J. Dawes (1986) *Botánica marina*. Editorial Noriega Limusa.
- Costas, E., Carrillo, E., Ferrero, L.M., Agrelo, M., Garcia-Villada, L., Juste, J., López- Rodas, V. (2001) Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3, 4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea herbicide. *Phycologia* 40, 391–398.
- Costas, E., Flores-Moya, A., López-Rodas, V. (2008) Rapid adaptation of algae to extreme environments (geothermal waters) by single mutation allows Noah's Arks for photosynthesizers during the Neoproterozoic Snowball Earth? *New Phytologist* 189, 922–932.
- Costas, E., Flores-Moya, A., Perdignes, N., Mancero, E., Blanco, J.L., García, M.E., López-Rodas, V. (2007) How eukaryotic algae can adapt to the Spain's Rio Tinto: a neo-Darwinian proposal for rapid adaptation to an extremely hostile ecosystem. *New Phytologist* 175, 334–339.
- Costas, E., Gonzalez, R., López-Rodas, V., Huertas, I.E. (2013) Mutation of microalgae allows phytoplankton dispersion through ships biofouling. *Biological Invasions* 15, 1739–1750.
- Cowan, G.A. (1976) Natural fission reactor. *Scientific American* 235, 36–47.
- Crow, J.F., Kimura, M. (1970) *An Introduction to Population Genetics Theory*. Burgess International Group Incorporated, Edina, MN.
- Cunningham, J. R. (1977) *The physics of Radiology*. Springfield, III, Charles C. Thomas.
- Dadachova, E., Bryan, R.A., Huang, X., Moadel, T., Schweitzer, A.D. (2007) Ionizing Radiation Changes the Electronic Properties of Melanin and Enhances the Growth of Melanized Fungi. *PLOS ONE* 2(5): e457.

- Dessouki, T.C.E., Hudson, J.J., Neal, B.R., Bogard, M.J. (2005) The effects of phosphorus additions on the sedimentation of contaminants in a uranium mine pit-lake. *Water Research* 39, 3055–3061.
- Duport, P. A. (2003) Database of cancer induction by low-dose radiation in mammals: overview and initial observations. *International Journal of Low Radiation* 1, 120–131.
- Dutreix, J., Desgrez, A., Book, B., y Chevalier, C. (1980) *Física y biofísica: Radiaciones* 176-197. Editorial A. C. Madrid.
- Elkind, M., Sutton, H. (1959) X-ray damage and recovery in mammalian cells in culture. *Nature* 184, 1293-1295.
- Falkowski, P.G., Raven, J.A. (1997) *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell Science, Malden, MA.
- Fortin, C., Denison, F.H., Garnier -Laplace, J. (2007) Metal-phytoplankton interactions: modelling the effect of competing ions (H<sub>p</sub>, Ca<sub>2p</sub>, and Mg<sub>2p</sub>) on uranium uptake. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 242-248.
- Fortin, C., Dutel, L., and Garnier-Laplace, J. (2004) Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: the importance of the free uranyl ion. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 974–81.
- Gannutz, T.P. (1972) Effects of gamma radiation on lichens. I. Acute gamma radiation on lichen, algae and fungi. *Radiation Botany* 12, 331-333.
- García-Balboa, C., Baselga-Cervera, B., García-Sánchez, A., Mariano-Igual, J., López-Rodas, V., and Costas, E. (2013) Rapid adaptation of microalgae to extremely polluted waterbodies from uranium mining: an explanation of how the mesophilic organisms can rapidly colonize extremely toxic environments. *Aquatic Toxicology* 144, 166-123.
- García-Balboa C., López-Rodas V., Huertas E., Baselga-Cervera, B., Costas, E. (En prensa) Uranium recovery using genetically improved microalgae *Environmental Microbiology and Environmental Microbiology Reports*.
- García-Villada, L., López-Rodas, V., Bañares, E., Flores-Moya, A., Costas, E. (2002) Evolution of microalgae in highly stressing environments: an experimental model analyzing the rapid adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) from sensitivity to resistance against 2, 4, 6,-trinitrotoluene (TNT) by rare preselective mutation. *Journal of Phycology* 38, 1074–1081.
- García Villada, L., Rico, M., Altamirano, M., Sanchez, L., López Rodas, V., Costas, E. (2004) Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterization and future implications in the use of copper sulphate as algicide. *Water Research* 38, 2207–2213.
- Gileva, E. A., Timofeeva, N.A. y Timofeev Resovskii, N. V. (1977) Influence of <sup>60</sup>Co gamma irradiation on the growth of *Chlorella* cultures. The present status and future prospect of radiation stimulation in crop plants. *American Journal of Botany* 61,909-913.
- González, R., García-Balboa, C., Rouco, M., Lopez-Rodas, V., Costas, E. (2012) Adaptation of microalgae to lindane: a new approach for bioremediation. *Aquatic Toxicology* 109, 25–32.
- Gould, S.J. (2002) *The Structure of Evolutionary Theory*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge.
- HAMPL, W., Altmann, H., Birbl, R. (1971) Unterschiede und beeinflussung der erliolungskapazität von Chlorellazeelen in verschiedenen stadien zellzyklus. *Radiation Botany* 11, 201-207.
- Horikoshi, T., Nakajima, A., Sakaguchi, T. (1979) Uptake of uranium by various cell fractions of *Chlorella regularis* (PMID: 542634). *Radioisotopes* 28, 485-488.
- Horikoshi, T., Nakajima, A., and Sakaguchi, T. (1979) Uptake of uranium by *Chlorella regularis*, *Agricultural and Biological Chemistry* 43, 617–623.
- Jacobson, B. (1957) Evidence for recovery from X-ray damage in *Chlamydomonas*. *Radiation Research* 7, 394-406.
- Joiner, M.C. (1994) Induced Radioresistance: An Overview and Historical Perspective. *International Journal of Radiation Biology* 65, 79–84.
- Kalin, M., Wheeler, W.N., Meinrath, G. (2005) The removal of uranium from mining waste water using algal/microbial biomass. *Journal of Environmental Radioactivity* 78, 151-159.
- Kraus, P. (1969) Resistance of blue-green algae to <sup>60</sup>Co gamma radiation. *Radiation Botany* 1, 481- 489.
- Kunz, N.P. (1972) Response of the alga *Chlorella sorokimiana* to <sup>60</sup>Co gamma radiation. *Nature* 5343, 178-179.

- Küzin, A.H., Angelova-Patarinska, Z. (1970) Stimulating effect of small doses of x-radiation on the simultaneous gemmation of yeast cells. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences* 23, 1421-1424.
- Latorre, E. (1979) *Radiobiología médica* 25-51. Editorial A. C. Madrid.
- López-Rodas, V., Agrelo, M., Carrillo, E., Ferrero, L., Larrauri, A., Martín-Otero, L., Costas, E. (2001) Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *European Journal of Phycology* 36, 179–190.
- López-Rodas, V., Flores-Moya, A., Maneiro, E., Perdigones, N., Marva, F., García, M.E., Costas, E. (2007) Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as result of pre-selective mutations. *Evolutionary Ecology* 21, 535–547.
- López-Rodas, V., Marvá, F., Costas, E., Flores-Moya, A. (2008a) Microalgal adaptation in the stressful acidic, metal-rich mine waters from Mynydd Parys (N Wales, UK) could be due to selection of pre-selective mutants. *Environmental and Experimental Botany* 61, 43–48.
- López-Rodas, V., Marvá, F., Rouco, M., Costas, E., Flores-Moya, A. (2008b) Adaptation of the chlorophycean *Dictyosphaerium chlorelloides* to the stressful acidic, mine metal-rich waters from Aguas Agrias Stream (SW Spain) as result of pre-selective mutations. *Chemosphere* 72, 703–707.
- López-Rodas, V., Perdigones, N., Marvá, F., Maneiro, E., Rouco, M., Delgado, A., Flores-Moya, A., Costas, E. (2009) Living in Vulcan' forge: Algal adaptation to stressful geothermal ponds on Vulcano Island (southern Italy) as result of pre-selective mutation. *Phycological Research* 57, 111–117.
- López-Rodas, V., Rouco, M., Sánchez-Fortún, S., Flores-Moya, A., Costas, E. (2011) Genetic adaptation and acclimation of phytoplankton along a stress gradient in the extreme waters of the Agrío river–Caviahue lake (Argentina). *Journal of Phycology* 47, 1036–1043.
- Lovelock, J. (1988). *The Ages of Gaia: A Biography of our Living Planet*. W.W. Norton, New York.
- Margulis, L., Karlene V. Schwartz (1985) *Cinco Reinos*. Editorial Labor.
- Markich, S.J. (2002) Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview. *Scientific World Journal* 2, 707–729.
- Martínez, M. C., Fernandez, G. J. (1983) Efecto de la radiación gamma sobre el crecimiento, productividad y contenido proteico de *Chlorella pyrenoidosa* Junta energía Nuclear 537.
- Marvá, F., López-Rodas, V., Rouco, M., Navarro, M., Toro, F.J., Costas, E., Flores-Moya, A. (2010) Adaptation of green microalgae to the herbicides simazine and diquat as result of pre-selective mutations. *Aquatic Toxicology* 96, 130–134.
- Mori, M., Benotmane, M.A., Vanhove D., van Hummelen P., Hooghe-Peters, E.L., Desaintes C. (2004) Effect of ionizing radiation on gene expression in CD4+ T lymphocytes and in Jurkat cells: unraveling novel pathways in radiation response. *Cellular and Molecular Life Science* 61, 1955-1964.
- Nelson, J., Braby, L., Roesch, W. (1980) Rapid Repair of Ionizing Radiation Injury in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Radiation Research* 83, 2, 279-289.
- Palumbi, S.R. (2001) Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science* 293, 1786-1790.
- Perales-Vela, H.V., Peña-Castro, J.M., Cañizares-Villanueva, R.O. (2006) Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* 64, 1–10.
- Posher, H.B. (1965) Effect of gamma irradiation on growth colony-forming ability and some cellular constituents of *Chlorella pyrenoidosa*. *Radiation Botany* 5, 129-141.
- Posner, H. B. (1965) Effect of gamma irradiation on growth colony-forming ability and some cellular constituents of *Chlorella pyrenoidosa* *Radiation Botany* 5, 129-141.
- Posner, H. B., Sparrow, A. H. (1964) Survival of *Chlorella* and *Chlamydomonas* after acute and chronic gamma radiation. *Radiation Botany* 4, 253-257.
- Sager, R. (1985) Chloroplast genetics. *BioEssays* 3, 180–184.
- Sager, R., Burton, W.G., Roberts, R.J., Myers, P.A. (1977) A site-specific single-strand endonuclease from the eukaryote *Chlamydomonas*. *Proceedings of National Academy of Science* 74, 2687–2691.
- Scagel, R. F., Bandoni, R. J., Maze, J.R., Rouse, G. E., Schofield, W. B., Stein, J. R. (1991) *Plantas no vasculares*. Editorial Omega.
- Schiermeier, Q. (2010) Ocean greenery under warming stress. *Nature*, <http://dx.doi.org/10.1038/news.2010.379> (Published online).
- Seuberling, H.B. (1970) X-ray induced stimulation of cell division in *Suglena Gracilis*. *Stimulation Newsletter* 1, 4-5.

- Simon, O., Floriani, M., Cavalie, I., Camilleri, V., Adam, C., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J. (2011) Internal distribution of uranium and associated genotoxic damages en the chronically exposed bivalve *Corbicula fluminea*. *Journal Environmental Radioactivity* 102, 766-773.
- Soon, C., Mo, J., Young, S., Hee, K., Meeseon, M., Sun, H., Khi, Y., Soon, C., Woo, Y., Joon, K. (2007) Low-dose of Ionizing Radiation Enhances Cell Proliferation Via Transient ERK1/2 and p38 Activation in Normal Human Lung Fibroblasts. *Journal Radiation Research* 48, 407-415.
- Suzuki, K., Kodama, S. and Watanabe, M. (2001) Extremely Low-Dose Ionizing Radiation Causes Activation of Mitogenactivated Protein Kinase Pathway and Enhances Proliferation of Normal Human Diploid Cells. *Cancer research* 61, 5396-5401.
- Tsezos, M., Volesky, B. (1982) The mechanism of uranium bio-sorption by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnology and Bioengineering* 24, 385-401.
- Vogel, M., Günther, A., Rossberg, A., Li, B., Bernhard, G., and Raff, J. (2010) Bio-sorption of U (VI) by green algae *Chlorella vulgaris* in dependence of pH value and cell activity. *Science of the Total Environment* 409, 384-395.
- Wang, G. J., Cai, L. (2000) Induction of Cell-Proliferation Hormesis and Cell-Survival Adaptive Response in Mouse Hematopoietic Cells by Whole-Body Low-Dose Radiation. *Toxicological Sciences* 53: 369-376.
- Ward, J. F., Limoli, C.L., Calabro-Jones, P. and Evans, J.W. (1988) Radiation vs.chemical damage to DNA. In "Anticarcinogenesis and Radiation Protection" (Nygaard O.F and Ceruttii, eds) Plenum, New York.
- Zhang, H.Q., Lin, A.P., Sun, Y., Deng, Y.M. (2001) Chemo-and radio-protective effects of polysaccharide of *Spirulina platensis* on hemopoietic system of mice and dogs. *Acta Pharmacologica Sinica* 22, 1121-1124.
- Zheng, B., Zheng, Z., Zhang, J.X., Qun, L., Wang, J., Zhao, Y. (2012) The removal of *Microcystis aeruginosa* in water by gamma-ray irradiation. *Separation and Purification Technology* 85, 165-170.

#### PÁGINAS WEB CONSULTADAS

www.Flickr.com  
 earthguide.ucsd.edu  
 ocw.mit.edu/...radiation.../ef\_of\_rad\_on\_dna.pdf. 22.55  
 www.Wikipedia.com  
 www.Biosigma.com  
 www.cog.es

## GLOSARIO

- Gray (Gy)** Unidad que mide la dosis absorbida de radiaciones ionizantes por un determinado material. Un gray es equivalente a la absorción de un julio de energía ionizante por un kilogramo de material irradiado.
- KeV** Energía cinética que adquiere un electrón cuando es acelerado por una diferencia de potencial de 1 voltio. Equivale a  $1,602176462 \times 10^{-19}$  J y  $1 \text{ keV} = 10^3$  electrónVoltios
- Rad** (Radiation Absorbed Dose) Es la cantidad de energía absorbida por la unidad de masa de un objeto irradiado. Diferentes materiales que reciban la misma cantidad de radiaciones pueden no absorber la misma cantidad de energía.
- Sievert (Sv)** Unidad que mide la dosis de radiación absorbida por la materia viva, corregida por los posibles efectos biológicos producidos. 1 Sv es equivalente a un julio entre kilogramo (J/kg). Esta unidad da un valor numérico con el que se pueden cuantificar los efectos estocásticos producidos por las radiaciones ionizantes.

# ADENDA

## Condiciones de Irradiación.

Centro Oncológico de Galicia Servicio de Radiofísica		Fecha: 12/03/2013
Paciente: Irradiación		Ident.: ALGAS
Tratamiento: Theratron 780 (modif)		Médico:
Tiempos Directos	Dosis Ses.: 100000 cGy = 1000 Gy	Dosis Tot.: 100000 cGy
Nombre Haz:	PA	
Unidad de Tto.:	Ther. 780	
Tipo Rad.:	Cobalto 60	
Energía:	1.25 Mev	
Técnica:	DFS	
Ang. Brazo:	180.0°	
Ang. Colim.:	180.0°	
Camp. Long.:	X: 350 mm	
Camp. Transv.:	Y: 350 mm	
DFS:	650 mm	
Punto Norm.:	(0.0, 0.0)	
Profund. Norm.:	15.0 mm	
Ident. Cuña:	No	
Or. Cuña:	-	
Colim. Sec.:	No	
Bandeja:	-	
Dist. Fte.-Band.:	-	
Dosis Ref.:	99.866 cGy / min	
Campo Ref.:	100 mm	
DFS Ref.:	800 mm	
Prof. Ref.:	5 mm	
Factores de Cálculo:		
Fact. Energ.:	-	
Fact. Cono:	-	
C.Eq. Abierto:	348.9	
C.Eq. Conform.:	-	
Fact. Colim.:	1.057	
Fact. Tejido:	-	
Fact. TMR:	1.077	
Fact. Tasa:	-	
Fact. Rotac.:	-	
Fact. Cuña:	-	
Fact. Bandeja:	-	
Fact. Asimetría:	-	
Fact. Fuera de Eje:	1.000	
Dosis Pto. Norm.:	-	
Peso:	100.0 %	
Dosis/Ses. ICRU:	100000.0 cGy	
Dosis/Tot. ICRU:	100000.0 cGy	
Isodosis Ref.:	100.0 %	
Tiempo / UM:	632.82 min ≈ 633 min	
Impreso por: C Fernández		Médico:

1 cm

FRASCO

CABA METALIZADO

MESA

0.5 cm (base caja)

Profundidad de cálibro =  
espesor base caja + prof. media  
cálculo en el frasco =  
0,5 + 1 = 1,5 cm

DFS = 65 cm

gantry = 180°

## Valores en cls/ml para las microalgas empleadas en el la primera Fase.

*A las 0 horas*

<i>Especies</i>	<i>Control</i>	<i>50 Gy</i>	<i>100 Gy</i>	<i>250 Gy</i>	<i>500 Gy</i>	<i>1000 Gy</i>
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	166000	264000	452000	246000	214000	199000
<i>Microcistis aeruginosa</i>	624000	820000	552000	642000	644000	490000
<i>Nitzchia closterium</i>	636000	464000	304000	345000	412000	410000
<i>Emiliana huxleyi</i>	36000	33000	37000	35000	36000	32000
<i>Tetraselmis suecica</i>	28000	25000	58000	59000	72000	43000

*A las 24 horas*

<i>Especies</i>	<i>Control</i>	<i>50 Gy</i>	<i>100 Gy</i>	<i>250 Gy</i>	<i>500 Gy</i>	<i>1000 Gy</i>
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	220000	384000	560000	325000	206000	236000
<i>Microcistis aeruginosa</i>	916000	100800 0	590000	591000	804000	564000
<i>Nitzchia closterium</i>	685000	480000	340000	327000	428000	402000
<i>Emiliana huxleyi</i>	39000	25000	23000	20000	28000	23000
<i>Tetraselmis suecica</i>	35000	27000	58000	50000	66000	40000

*A las 48 horas*

<i>Especies</i>	<i>Control</i>	<i>50 Gy</i>	<i>100 Gy</i>	<i>250 Gy</i>	<i>500 Gy</i>	<i>1000 Gy</i>
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	280000	432000	590000	402000	220000	207000
<i>Microcistis aeruginosa</i>	1120000	100400 0	600000	789000	690000	602000
<i>Nitzchia closterium</i>	752000	520000	440000	404000	390000	304000
<i>Emiliana huxleyi</i>	41000	18000	19000	18000	18700	12000
<i>Tetraselmis suecica</i>	39000	30000	45000	40000	56000	31000

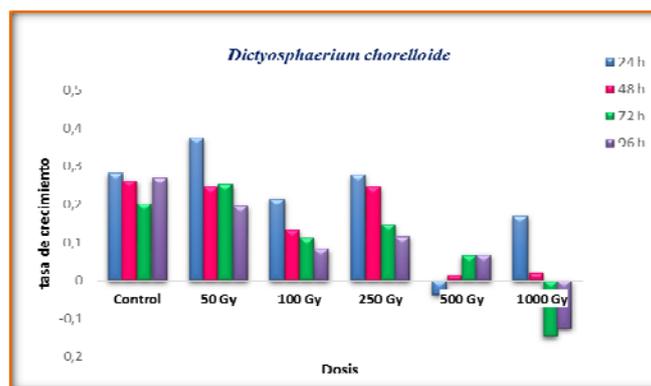
A las 72 horas

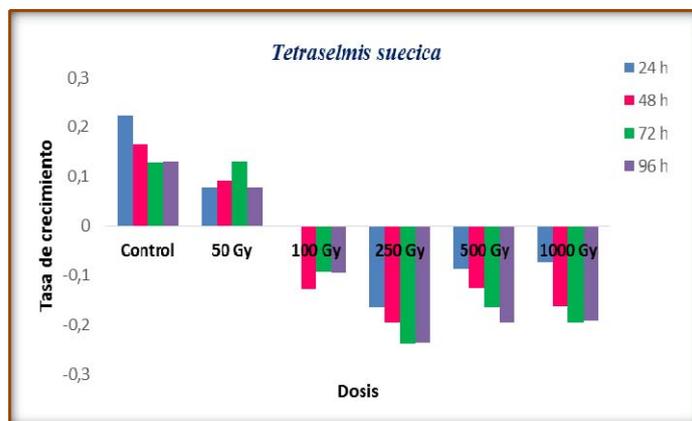
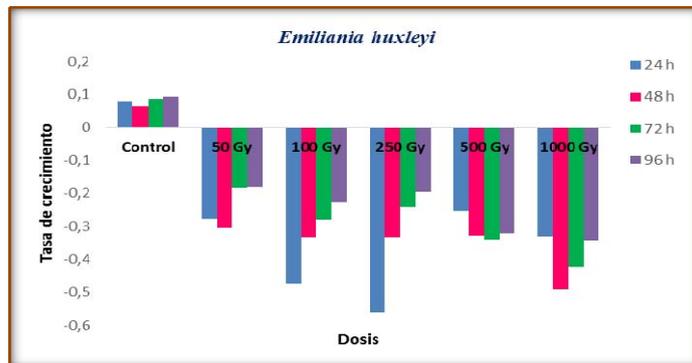
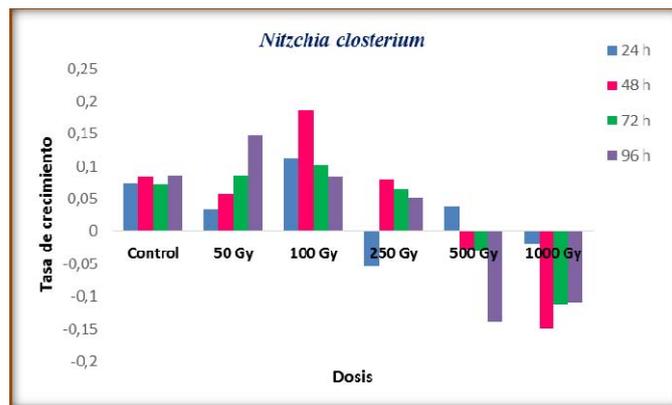
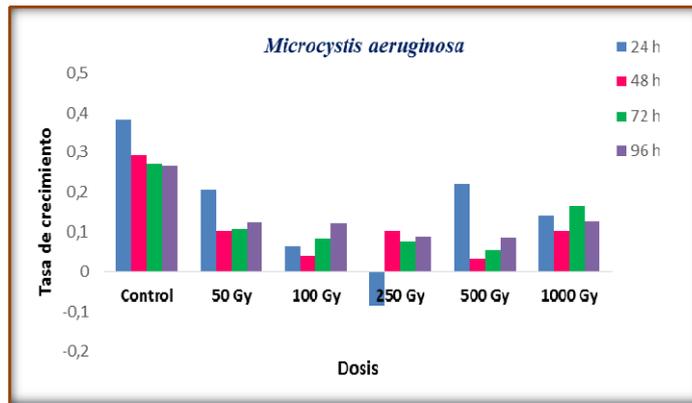
Especies	Control	50 Gy	100 Gy	250 Gy	500 Gy	1000 Gy
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	304000	562000	632000	381000	260000	128000
<i>Microcistis aeruginosa</i>	1404000	1130000	710000	810000	760000	804000
<i>Nitzschia closterium</i>	792000	600000	412000	418000	376000	292000
<i>Emiliana huxleyi</i>	47000	19000	16000	17000	13000	9000
<i>Tetraselmis suecica</i>	41000	37000	44000	29000	44000	24000

A las 96 horas

Especies	Control	50 Gy	100 Gy	250 Gy	500 Gy	1000 Gy
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	488000	580000	628000	391000	280000	120000
<i>Microcistis aeruginosa</i>	1810000	1352000	896000	920000	910000	810000
<i>Nitzschia closterium</i>	896000	840000	424000	426000	236000	264000
<i>Emiliana huxleyi</i>	52000	16000	15000	16000	10000	8100
<i>Tetraselmis suecica</i>	47000	34000	39600	23000	33000	20000

Representaciones gráficas de las tasas de crecimiento  $r$  para la primera Fase.





## Valores en cls/ml para las microalgas empleadas en la segunda Fase.

*A las 0 horas*

<i>Especies</i>	<i>Control</i>	<i>50 Gy</i>	<i>100 Gy</i>	<i>250 Gy</i>	<i>500 Gy</i>	<i>1000 Gy</i>
<i>Chlamydomonas fonticola</i>	584000	1604000	586000	446000	736000	468000
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	254000	506000	406000	558000	502000	618000
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i>	184000	232000	140000	126000	206000	223000
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	684000	318000	374000	316000	720000	698000

*A las 24 horas*

<i>Especies</i>	<i>Control</i>	<i>50 Gy</i>	<i>100 Gy</i>	<i>250 Gy</i>	<i>500 Gy</i>	<i>1000 Gy</i>
<i>Chlamydomonas fonticola</i>	890000	1640000	524000	422000	504000	996000
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1088000	716000	586000	484000	644000	872000
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i>	406000	292000	224000	164000	170000	206000
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	924000	589000	556000	589000	1020000	632000

*A las 48 horas*

<i>Especies</i>	<i>Control</i>	<i>50 Gy</i>	<i>100 Gy</i>	<i>250 Gy</i>	<i>500 Gy</i>	<i>1000 Gy</i>
<i>Chlamydomonas fonticola</i>	1190000	1720000	732000	508000	412000	788000
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1348000	844000	692000	472000	540000	880000
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i>	592000	561000	402000	294000	204000	168000
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	1340000	857000	809000	554000	744000	604000

*A las 72 horas*

<i>Especies</i>	<i>Control</i>	<i>50 Gy</i>	<i>100 Gy</i>	<i>250 Gy</i>	<i>500 Gy</i>	<i>1000 Gy</i>
<i>Chlamydomonas fonticola</i>	1680000	1390000	1190000	720000	551000	880000
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1540000	1040000	724000	696000	670000	944000
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i>	720000	708000	572000	512000	210000	459000
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	1880000	1316000	1240000	890000	690000	590000

A las 96 horas

Especies	Control	50 Gy	100 Gy	250 Gy	500 Gy	1000 Gy
<i>Chlamydomonas fonticola</i>	1960000	1920000	1440000	1180000	1370000	1230000
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1932000	1317000	1048000	744000	732000	774000
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i>	864000	928000	604000	615000	452000	420000
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	2384000	1560000	1890000	1392000	1128000	624000

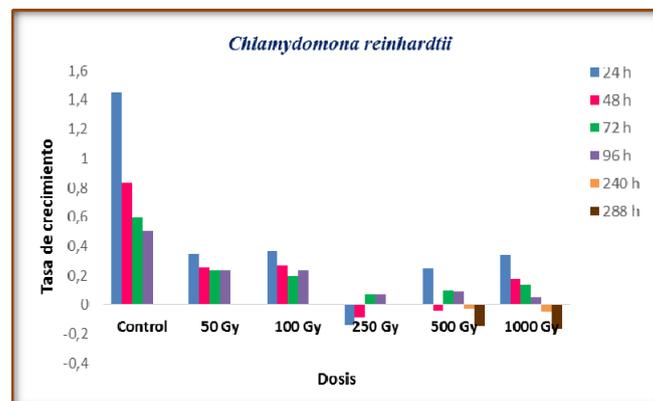
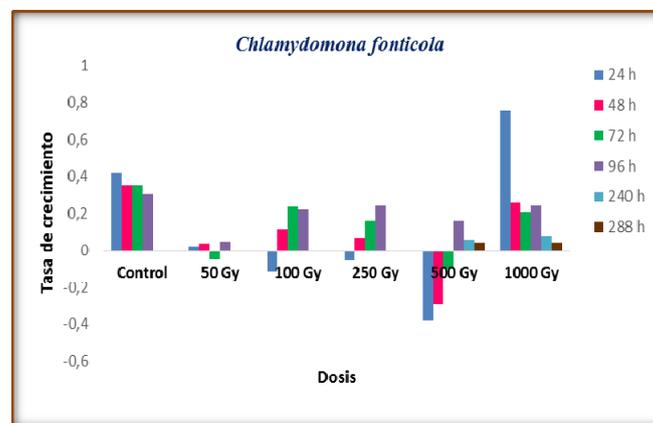
A las 240 horas

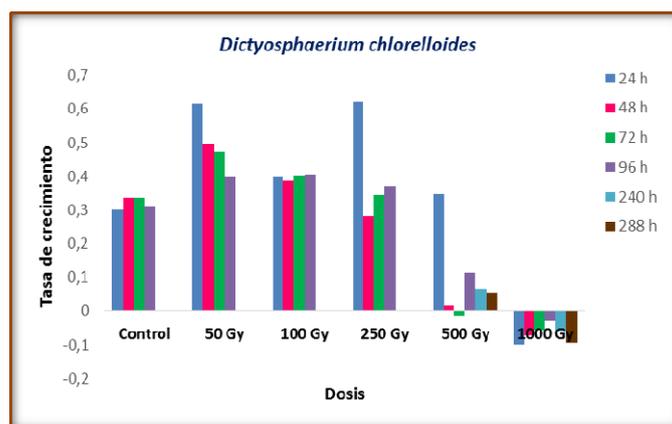
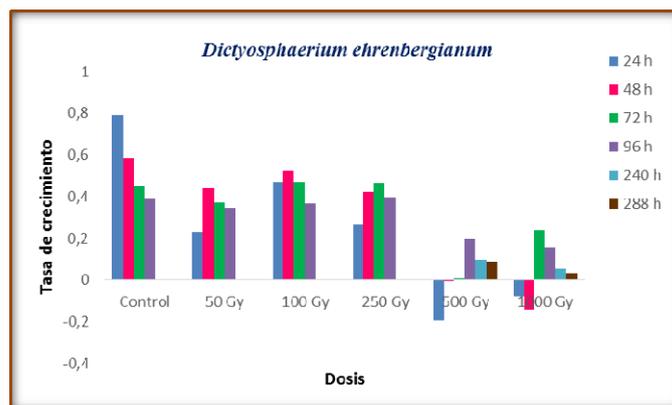
Especies	500 Gy	1000 Gy
<i>Chlamydomonas fonticola</i>	1300000	1020000
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	402000	405000
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i>	551000	381000
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	1411000	394000

A las 288 horas

Especies	500 Gy	1000 Gy
<i>Chlamydomonas fonticola</i>	1210000	760000
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	88000	83000
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i>	602000	336000
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	1376000	224000

## Representaciones gráficas de las tasas de crecimiento $r$ para la segunda Fase.





**Composición de los medios de cultivo empleados (datos obtenidos de la colección de algas de cultivo UTEX de la Universidad de Texas).**

Component	Amount	Stock Solution Concentration	Final Concentration
NaNO <sub>3</sub> (Fisher BP360-500)	10 mL/L	30 g/200 mL dH <sub>2</sub> O	17.6 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma P 3786)	10 mL/L	0.8 g/200 mL dH <sub>2</sub> O	0.23 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Sigma 230391)	10 mL/L	0.15 g/200 mL dH <sub>2</sub> O	0.03 mM
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (Sigma C-3881)	10 mL/L	0.72 g/200 mL dH <sub>2</sub> O	0.24 mM
Citric Acid·H <sub>2</sub> O (Fisher A 104)	10 mL/L	0.12 g/200 mL dH <sub>2</sub> O	0.031 mM
Ferric Ammonium Citrate	10 mL/L	0.12 g/200 mL dH <sub>2</sub> O	0.021 mM
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O (Sigma ED255)	10 mL/L	0.02 g/200 mL dH <sub>2</sub> O	0.0027 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Baker 3604)	10 mL/L	0.4 g/200 mL dH <sub>2</sub> O	0.19 mM
BG-11 Trace Metals Solution	1 mL/L		
Sodium Thiosulfate Pentahydrate (agar media only, sterile) (Baker 3946)	1 mL/L	49.8 g/200 mL dH <sub>2</sub> O	1 mM

**Medio BG11**

Component	Amount	Stock Solution Concentration	Final Concentration
NaNO <sub>3</sub> (Fisher BP360-500)	1 mL	7.5 g/100 mL dH <sub>2</sub> O	880 µM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (MCIB 742)	1 mL	0.5 g/100 mL dH <sub>2</sub> O	36 µM
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O (Sigma 307815)	1 mL	3 g/100 mL dH <sub>2</sub> O	106 µM
Trace Metals Solution	1 mL/L		
Vitamin B <sub>12</sub>	1 mL/L		
Biotin Vitamin Solution	1 mL/L		
Thiamine Vitamin Solution	1 mL/L		

**Medio F/2**

