

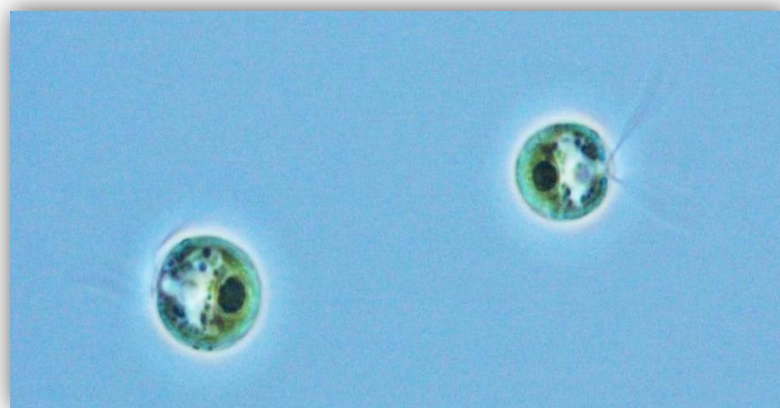
UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Traballo de Fin de Grao

2014

## Efecto dun microcontaminante acuático sobre un microorganismo fotosintético







**UNIVERSIDAD DE A CORUÑA**  
**Facultad de Ciencias**  
**Departamento de Biología Celular y Molecular**  
**Área de Microbiología**

## **TRABALLO FIN DE GRAO**

Dna. Carmen Rioboo Blanco autoriza a presentación do Traballo de Fin de Grao “Efecto dun microcontaminante acuático sobre un microorganismo fotosintético” presentado por Adriana Paz Otero para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

En A Coruña, a 18 de xuño de 2014

Asdo.: Carmen Rioboo Blanco



## Agradecementos

Desexo expresar o meu sincero agradecemento a miña titora, Carmen Rioboo, sen a cal non sería posible a realización deste traballo. Moitas grazas pola súa axuda, paciencia, comprensión e sobre todo por compartir os seus coñecementos comigo.

Da mesma forma, agradezo a todo o persoal do Laboratorio de Microbioloxía por brindarme unha man cando foi necesario.

Aproveito para dar as grazas a todas esas persoas que son un apoio constante: a meus amigos e compañeiros da facultade por sacarme sempre un sorriso, a Alberto por estar o meu lado en cada momento, e en especial a meus pais, por confiar en min e por concederme a oportunidade de chegar ata aquí, simplemente por todo.



# Índice

Resumo .....	2
1. <b>Introdución</b> .....	3
2. <b>Obxectivos</b> .....	5
3. <b>Material e métodos</b> .....	6
3.1.    Descrición de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Dangeard).....	6
3.2.    Cultivo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	6
3.3.    Preparación da solución concentrada de paraquat .....	7
3.4.    Determinación da densidade celular .....	7
3.5.    Determinación espectrofotométrica de pigmentos fotosintéticos .....	8
3.6.    Determinación proteínas hidrosolubles .....	9
3.7.    Análise de <i>C. reinhardtii</i> mediante citometría de fluxo.....	10
3.8.    Análise estatística .....	12
4. <b>Resultados</b> .....	13
4.1.    Efecto do herbicida paraquat sobre o crecemento e o contido celular de pigmentos e proteínas de <i>C. reinhardtii</i> .....	13
4.2.    Efecto do paraquat sobre o crecemento, tamaño, autofluorescencia da clorofila <i>a</i> e viabilidade de <i>C. reinhardtii</i> en cultivos pre-expostos ó herbicida .....	18
5. <b>Discusión</b> .....	22
6. <b>Bibliografía</b> .....	26
Abreviaturas .....	30

## Resumo

O uso intensivo e extensivo de herbicidas pode provocar a contaminación dos medios acuáticos, afectando a calidade da auga e prexudicando ós organismos non diana, como son as microalgas. No presente estudo analizáronse os efectos do herbicida bipiridílico paraquat na microalga de auga doce *Chlamydomonas reinhardtii* a nivel do crecemento e do contido celular de pigmentos fotosintéticos e proteínas. Os resultados obtidos mostran que a exposición ó paraquat provoca alteracións significativas sobre o crecemento de *C. reinhardtii*. A taxa de crecemento da microalga é afectada negativamente de maneira dependente da concentración e do tempo de exposición, obténdose un valor de  $EC_{50}$  de 107,57 nM tras 96 horas de exposición. O contido celular de pigmentos e proteínas tamén se ve afectado, decrecendo significativamente en cultivos expostos ás concentracións máis altas ensaidas de paraquat tras 96 horas de exposición, o que pode ser debido ó mecanismo de acción do herbicida que provocaría a súa degradación oxidativa. Tamén se analizaron os posibles cambios no efecto tóxico do paraquat sobre a microalga *C. reinhardtii* en función de si estivo exposta previamente ó herbicida; este obxectivo abordouse mediante o estudo do crecemento e outros parámetros celulares analizados mediante citometría de fluxo, como o tamaño das células, a autofluorescencia da clorofila *a* e a viabilidade celular. A pre-exposición da microalga ó herbicida reduce o efecto negativo do mesmo cando *C. reinhardtii* se expón a novos aportes deste praguicida. Isto podería indicar que a exposición ó paraquat induce en *C. reinhardtii* certas adaptacións fisiolóxicas que aumentan a tolerancia desta microalga ante o efecto tóxico do herbicida, particularmente a nivel de parámetros como o crecemento, autofluorescencia da clorofila *a* e a viabilidade celular dos cultivos.



## 1. Introducción

Os praguicidas, como os herbicidas, achegan moitos beneficios á sociedade, empregándose para diversos fins na agricultura, industria, silvicultura e no ámbito doméstico. Sen embargo, moitos de estes compostos poden ser prexudiciais para o home e outras especies, podendo persistir no medioambiente durante décadas (Moreno, 2003).

A contaminación dos medios acuáticos debido a estes compostos orgánicos é considerado un importante problema ambiental (Hela *et al.*, 2004). O uso extensivo e intensivo dos herbicidas pode causar a polución de augas superficiais e subterráneas (Moreno, 2003; Katsumata *et al.*, 2006) podendo exercer a súa toxicidade sobre os organismos que alí habitan, aínda que non sexan a diana principal para a cal se deseñou o herbicida (Deneer, 2000; Warren *et al.*, 2003).

As microalgas forman parte dos ecosistemas acuáticos, constituíndo a base das cadeas tróficas; polo tanto, calquera efecto nocivo sobre elas pode afectar ós niveis tróficos superiores, modificando as comunidades e alterando o ecosistema (De Lorenzo *et al.*, 2002; Rioboo *et al.*, 2007). Ademais, as microalgas manifestan unha alta sensibilidade ante un amplo grupo de contaminantes, tanto orgánicos como inorgánicos (Haglund, 1997) e responden de forma rápida ós cambios ambientais debido o seu tempo de xeración corto (De Lorenzo *et al.*, 2002; Rioboo *et al.*, 2007). Estas características fan destes microorganismos uns bos indicadores biolóxicos da contaminación en medios acuáticos (Hörnström, 1990; Mayer *et al.*, 1997). De feito, os bioensaios baseados na inhibición do crecemento das microalgas *Selenastrum capricornutum* e *Scenedesmus subspicatus* están incluídos dentro dos bioensaios de toxicidade obrigados para o rexistro de novos compostos químicos, tanto na Unión Europea como nos Estados Unidos (ISO 8692, 2012).

Un dos herbicidas que pode afectar potencialmente a organismos non diana como as microalgas é o paraquat (Fig. 1.1; 1-1'-dimetil- 4,4'-bipiridilo dicloruro), un herbicida bipiridílico de amplo espectro utilizado para o control da maleza de folla ancha (Suntres, 2002). Trátase dun composto de nitróxeno cuaternario non selectivo, que é rapidamente absorbido polas follas trala súa aplicación actuando por contacto directo coas plantas a

eliminar (Moreno, 2003). Aínda que a súa aplicación está parcialmente restrinxida e mesmo prohibida en varios países pola súa toxicidade (Baltazar *et al.*, 2013), o paraquat segue a ser un dos herbicidas máis utilizados no mundo (Santos, 2013). Ademais, o risco de contaminación polo paraquat vese reforzado pola súa alta solubilidade en auga ( $620 \text{ gr l}^{-1}$ ) (Tomlin, 2003), sendo frecuentemente detectado como contaminante nas augas superficiais de ecosistemas acuáticos (Zhou *et al.*, 2009).

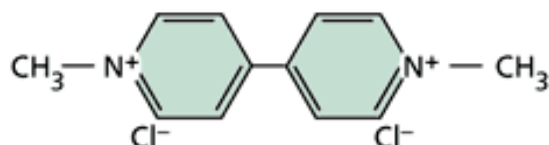


Figura 1.1. Estrutura química do herbicida paraquat.

Respecto ó mecanismo de acción, o paraquat compórtase como un potente axente químico do ciclo-redox (Jung e Kim, 2003) que actúa a nivel do cloroplasto ao interceptar electróns dende a cadea fotosintética do transporte de electróns a nivel do fotosistema I. A súa redución provoca a xeración dun radical libre que reacciona co osíxeno molecular dando lugar ó anión superóxido. Este anión é convertido en peróxido de hidróxeno, producíndose tamén outros radicais libres e especies reactivas de osíxeno (hidroxilo e peroxilo). Estas especies reactivas de osíxeno (ROS, *reactive oxygen species*) son extremadamente reactivas, destruindo compoñentes celulares como lípidos, proteínas, clorofilas ou ácidos nucleicos, podendo causar a morte da célula.

Nas últimas décadas foron descritos fenómenos de adaptación fisiolóxica por exposición ó herbicida en microalgas (Vartak e Bhargava, 1999), como *Chlamydomonas reinhardtii*, onde os sistemas de detoxificación celular basados en enzimas antioxidantes xogan un papel moi importante (Jansen *et al.*, 1989; Donahue *et al.*, 1997); tamén foron descritos outros mecanismos de aclimatación ó herbicida, que non implica a presenza destes enzimas, como a exclusión do paraquat do seu sitio activo (Shaaltiel e Gressel, 1986; Powles e Cornic, 1987).

## 2. Obxectivos

A vista do exposto, o obxectivo xeral do presente traballo é avaliar os potenciais efectos tóxicos do herbicida biperidílico paraquat sobre a microalga doceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii* (Dangeard). Este obxectivo abórdase dende dous eidos:

1. O estudo da citotoxicidade exercida por concentracións ambientalmente relevantes de paraquat sobre *C. reinhardtii* a nivel do crecemento dos cultivos e da composición bioquímica, concretamente mediante o estudo do contido celular de proteínas e de pigmentos fotosintéticos.
2. A análise de potenciais cambios no efecto tóxico do paraquat sobre *C. reinhardtii* en función de si a microalga estivo exposta previamente ó herbicida. Este punto abórdase a través do estudo comparado do efecto tóxico do paraquat sobre cultivos de *C. reinhardtii* previamente expostos a este herbicida fronte a cultivos que non estiveron en contacto co paraquat, mediante a análise do crecemento e de parámetros celulares como o tamaño, a autofluorescencia da clorofila *a* e a viabilidade celular.

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Descrición de *Chlamydomonas reinhardtii* (Dangeard)

A especie utilizada no presente estudo é *Chlamydomonas reinhardtii* (Dangeard). A cepa utilizada (CCAP 11/32A mt+) obtívose da Colección de Cultivos de Algas e Protozoos (CCAP; *Culture Collection of Algae and Protozoa*) do Laboratorio Mariño de Dunstaffnage (Escocia, Reino Unido). O xénero *Chlamydomonas* inclúese na división *Chlorophyta*, e dentro desta encádrase na clase *Chlorophyceae*, orde *Volvocales* e familia *Chlamydomonadaceae* (Bold e Wynne, 1985).

As células de *C. reinhardtii* presentan unha morfoloxía oval de aproximadamente 10 µm de longo por 3 µm de ancho. O plano corporal é polar, con dous flaxelos no extremo anterior e un único cloroplasto basal con forma de copa que ocupa a maior parte do espazo intracelular, e que contén un ou máis pirenoides (Harris, 2009). O cloroplasto adoita rodear ao núcleo, que está situado no centro e ten un nucleólo prominente. Arredor do núcleo adoita estar o aparato de Golgi e arredor deste último adoita estar un sáculo de retículo endoplasmático que conecta coa membrana plasmática. Tamén é frecuente encontrar vacúolos contráctiles no polo anterior da célula e mitocondrias entre o cloroplasto e a plasmalema. As células están rodeadas por parede, composta só por glicoproteínas fibrosas, agás na zona dos flaxelos.

*Chlamydomonas* reproducécese tanto asexual coma sexualmente. Para evitar a reprodución sexual neste traballo só se utilizaron células de mating +. O xénero *Chlamydomonas* é moi amplo e ten ampla distribución (augas doce, hábitats mariños, chan, etc.) i é moi utilizado en investigación biolóxica, sobre todo en estudos de fotosíntese, xenética molecular e ecotoxicoloxía.

#### 3.2. Cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*

Os cultivos de *C. reinhardtii* realízanse en medio Tris-acetato-fosfato (TAP, *Tris-acetate-phosphate*) (Harris, 2009) con algunhas modificacións, como a ausencia dunha fonte orgánica de carbono no medio e a utilización de nitrato como fonte de nitróxeno. A esta solución de

macroelementos engádeselle unha solución de oligoelementos (Algal-1, Nutrición Avanzada S.A.) en condicións de esterilidade. O medio de cultivo esterilízase en autoclave, así como todo o material empregado no estudo.

Os cultivos de mantemento efectúanse en botellas PYREX de 500 ml, a partir dos cales se tomarán os inóculos para cada experiencia, e mantéñense nunha cámara de temperatura controlada e constante a  $18 \pm 1$  °C e cunha iluminación de  $80 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionada por tubos fluorescentes Philips TLD de 36W, aplicada con un ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridade. Tódolos cultivos mantéñense aireados a un fluxo constante de  $10 \text{ l min}^{-1}$  de aire atmosférico insuflado cun turbosoplador e filtrado mediante filtros *Millipore FG* de  $0,20 \mu\text{m}$  de tamaño de poro antes da entrada no cultivo. En tódalas experiencias deste traballo, a densidade celular inicial dos cultivos é  $4 \times 10^5$  células  $\text{ml}^{-1}$  a partir dun inóculo en fase exponencial. Esta densidade foi seleccionada co fin de elixir aquela que permitise axustar o crecemento da microalga a unha curva sigmoidea que alcanzase a fase estacionaria ás 96 h en cultivos non tratados con herbicida.

### **3.3. Preparación da solución concentrada de paraquat**

Para este estudo utilizouse o herbicida paraquat comercializado por Riedel-de Haën (Sigma-Aldrich, Madrid). É un estándar Pestanal axeitado para a análise medioambiental, sometido a análise de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) para comprobar a súa pureza, superior ao 98%. Antes de cada experiencia, preparouse unha solución concentrada de paraquat (3 mM) disolvendo o paraquat puro comercial granulado en auga destilada e esterilizada. A cada un dos cultivos de *C. reinhardtii* engádese un volume determinado desta solución concentrada para obter as diferentes concentracións finais ensaiadas.

### **3.4. Determinación da densidade celular**

A densidade celular dos cultivos de *C. reinhardtii* determínase mediante o recuento total de células nunha cámara Neubauer, utilizando un microscopio NIKON Eclipse E400 (Nikon, Japon).

As taxas de crecemento (T.C.) para cada tempo e concentración do herbicida ensaída, expresadas en día<sup>-1</sup>, calcúlanse usando a seguinte fórmula:

$$T.C. = [\ln (N_t) - \ln (N_0)] / \ln 2 (t - t_0)$$

onde  $t_0$  e  $t$  son o tempo inicial e final do período estudado (ambos expresados en días) e  $N_t$  e  $N_0$  a densidade celular (células ml<sup>-1</sup>) en eses tempos.

A Concentración Efectiva Media (*Effective Concentration 50%*; EC<sub>50</sub>), é dicir a concentración da sustancia ensaída que provoca unha diminución do crecemento do 50% con respecto ó control, obtense mediante a interpolación gráfica nas curvas de concentración-resposta. Os datos para o cálculo das EC<sub>50</sub> foron axustados mediante unha regresión non lineal, usando unha curva loxística, cuxa función matemática é:

$$y = y_0 + [ a / (1 + (x / x_0) \exp(b))] ]$$

onde  $y$  é a taxa de crecemento expresada en porcentaxe respecto o control (cultivos sen herbicida);  $x$  é a concentración do herbicida (expresada en nM); os catro parámetros para esta función determinan, o valor mínimo de variable resposta ( $y_0$ ), a diferenza entre o valor máximo e o mínimo da variable resposta ( $a$ ), a pendente da curva ( $b$ ), e o valor de  $x$  cando a resposta toma un valor correspondente ó 50% da amplitude da función ( $x_0$ ).

### 3.5. Determinación espectrofotométrica de pigmentos fotosintéticos

Para a análise espectrofotométrica dos pigmentos de *C. reinhardtii*, primeiro procédese a centrifugación dun volume determinado de cada cultivo nunha centrífuga refrixerada ALC PK121R durante 15 minutos a 4.500 r.p.m. e 4 °C., recollendo así as células. A continuación procédese a extracción dos pigmentos, resuspendendo a biomasa en acetona ao 90% (v:v) e manténdoa durante 24 h a 4 °C en escuridade.

Unha vez que a extracción se completa, o extracto é centrifugado para retirar os restos celulares. Co sobrenadante, que contén os pigmentos extraídos, efectúanse lecturas de absorbancia nas seguintes lonxitudes de onda: 664, 647 e 480 nm, nun espectrofotómetro Shimadzu UV-1700, fronte a un branco de acetona ó 90 %.

Por último, calcúlanse as concentracións dos pigmentos cas seguintes ecuacións para as clorofilas de Jeffrey e Humphrey (1975) e para os carotenoides de Strickland e Parsons (1972):

$$\text{Clorofila } a = 11,93 A_{664} - 1,93 A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b = 20,36 A_{647} - 5,50 A_{664}$$

$$\text{Carotenoides totais} = 4,0 A_{480}$$

onde clorofila *a*, clorofila *b* e os carotenoides totais corresponden as concentracións de ditos pigmentos en  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de extracto e  $A_{664}$ ,  $A_{647}$ ,  $A_{480}$  son as absorbancias medidas a 664, 647 e 480 nm respectivamente.

### 3.6. Determinación proteínas hidrosolubles

Mediante o método de Bradford (1976) cuantificouse a concentración de proteínas hidrosolubles presente nas células de *C. reinhardtii*. O método fundaméntase no cambio de cor do colorante azul brillante de *Coomassie G-250* na resposta a diferentes concentracións de proteína. Este composto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) e aromáticos. O complexo colorante-proteína que se forma presenta un máximo de absorción a 595 nm.

Para recoller as células, centrifúgase un volume determinado de cada cultivo nunha centrífuga refrixerada ALC PK121R durante 15 minutos a 4.500 r.p.m. e 4 °C. A biomasa é resuspendida en auga destilada. Para conseguir a ruptura da parede celular das microalgas, a suspensión celular é sometida a un proceso de sonicación (5 x 30 s) mediante un sonicador LABSONIC mantendo as mostras sempre refrixeradas en auga con xeo. A continuación efectúase unha nova centrifugación para retirar os restos celulares.

Para a cuantificación das proteínas utilízase o reactivo preparado comercialmente por BioRad no produto *Protein Assay Kit*. Primeiro realízase unha recta de calibrado con concentracións de seroalbúmina bovina entre 0 e 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  en auga destilada, fronte a un branco tamén de auga destilada. O colorante azul de *Coomassie* engádese, nunha relación mostra:reactivo 4:1 (v:v), a cada unha das mostras e axitando suavemente. Logo déixase

incubar durante 15 minutos para que se produza a reacción colorimétrica. Finalmente, procédese a realizar as medidas de absorbancia nun espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 a 595 nm.

### 3.7. Análise de *C. reinhardtii* mediante citometría de fluxo

A citometría de fluxo (CMF) é unha técnica que permite determinar un alto número de propiedades e/ou funcións de células individuais a gran velocidade, empregando unha gran variedade de moléculas bioquimicamente específicas, non tóxicas e fluorescentes, en condicións próximas ó estado *in vivo* en exposicións de corta duración a niveis elevados de luz (Carter e Meyer, 1990).

As análises por citometría de fluxo das células de *C. reinhardtii* realizáronse nun citómetro de fluxo Gallios (Beckman Coulter, Fullerton, CA) equipado con dous láseres de excitación como fonte de luz, un que emite a 488 nm e outro a 633 nm. Este citómetro presenta detectores da luz refractada no ángulo anterior (*forward light scatter*, FS), parámetro proporcional ó tamaño da célula, e da luz refractada no ángulo lateral (*side light scatter*, SS), parámetro proporcional á complexidade intracelular. Ademais, presenta catro detectores de fluorescencia en función da lonxitude de onda: FL1 (fluorescencia verde, 505-545 nm), FL2 (fluorescencia amarela, 560-590), FL3 (fluorescencia alaranxada, 605-635) e FL4 (fluorescencia vermella, 660-700). Os datos recóllense e analízanse utilizando o programa Gallios (versión 1.1; Beckman Coulter) que proporciona os parámetros estatísticos das distribucións dos valores obtidos. Polo menos 10.000 células foron analizadas por mostra. Todos os experimentos de citometría de fluxo se realizaron dúas veces e os duplicados das mostras analizáronse no citómetro de fluxo. O láser de excitación a 488 nm (luz azul) utilizouse como fonte de iluminación para todos os parámetros ensaiados.

#### *Análise do tamaño celular e autofluorescencia da clorofila a*

Para a análise do tamaño celular e autofluorescencia da clorofila *a* de *C. reinhardtii*, prepáranse suspensións celulares de cada cultivo, en tubos de citometría de poliestireno de 12 x 75 mm, a unha densidade final de  $4 \times 10^5$  células ml<sup>-1</sup> en tampón fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*). Os tres parámetros analízanse en modo logarítmico, calculándose a



media (u. a.) para as poboacións celulares identificadas no histograma mediante o programa do equipo utilizado.

### *Tamaño celular*

As medidas recóllense no detector que recolle a luz dispersada do láser entre 1 e 20° respecto ao feixe, así obtemos a luz refractada no ángulo anterior (*forward scatter light*, FS), que é proporcional ao tamaño ou volume celular (Mullaney *et al.*, 1969).

### *Autofluorescencia da clorofila a*

*C. reinhardtii* emite *in vivo* fluorescencia natural debido á presenza de clorofila e de outros pigmentos accesorios. A fluorescencia da clorofila *a* excítase con luz a 488 nm e emite no rango de 680-720 nm, polo que a autofluorescencia microalgal é recollida no detector FL4.

### *Análise da viabilidade celular*

Para o estudio da viabilidade celular de *C. reinhardtii*, realizouse un ensaio baseado na tintura co composto fluoroxénico diacetato de fluoresceína (DAF) (*Fluorescein diacetate*; FDA).

Este composto é un éster non polar non fluorescente que atravesa a membrana citoplasmática das células. Unha vez dentro, a molécula de DAF perde os grupos acetato debido á acción de esterases non específicas citoplasmáticas que hidrolizan os enlaces éster nas células activas. A fluoresceína resultante é unha molécula polar hidrófila altamente fluorescente, que queda retida no interior celular daquelas células que teñan intacta a integridade da súa membrana plasmática. Neste caso, a ausencia de fluorescencia verde da fluoresceína indica efectos tóxicos sobre a membrana celular e/ou a actividade das esterases, que son enzimas esenciais para o funcionamento normal da célula. Deste modo, poderemos distinguir entre células fluorescentes metabolicamente activas (DAF+) e células non fluorescentes non metabolicamente activas (DAF-).

Prepáranse suspensións celulares de cada cultivo a unha densidade final de  $4 \times 10^5$  células  $\text{ml}^{-1}$  en tampón PBS estéril, e incúbanse en presenza dunha concentración final de DAF de 0,4  $\text{g ml}^{-1}$  (a partir dunha solución concentrada de 100  $\text{g ml}^{-1}$  en dimetilsulfóxido (DMSO), gardada a -

20°C). Despois de 15 min en escuridade e a temperatura ambiente, as mostras analízanse no citómetro de fluxo.

A fluorescencia de emisión de DAF no citómetro é analizada no detector FL1 (505-545) en escala logarítmica. Os resultados obtidos exprésanse como a porcentaxe de células metabolicamente activas (rexión DAF+), con respecto ao total de células analizadas.

### **3.8. Análise estatística**

En primeiro lugar, calculáronse as medias e as desviacións estándar para cada tratamento. En cada ensaio, a hipótese de que a concentración de paraquat no medio non afecta ao parámetro de estudo, analízase mediante unha análise da varianza de un factor (ANOVA). Cando a hipótese é rexeitada, utilízase o test Rango Múltiple de Duncan para analizar de que forma afecta cada concentración ao parámetro estudado. O test de Duncan utilízase ao nivel de significación do 0,05 ( $p < 0,05$ ). Para o tratamento estatístico dos datos utilízase o programa estatístico IBM SPSS Statistic (versión 21.0.0).

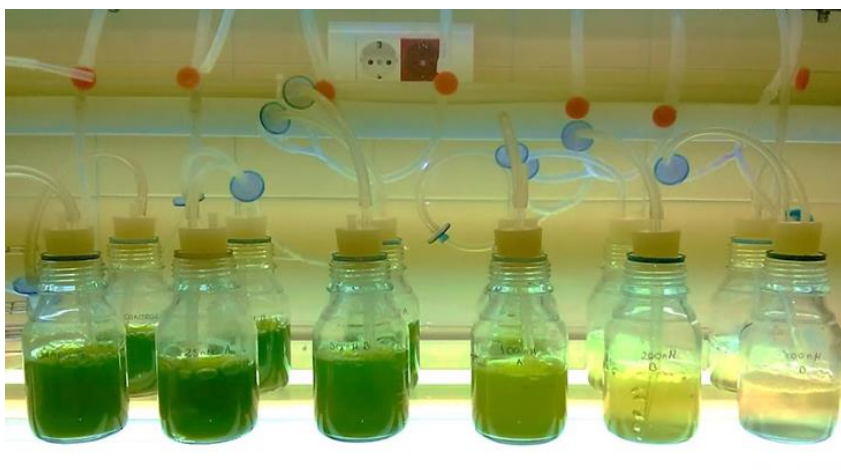
As gráficas creáronse co paquete de análise estatística e de gráficas avanzadas SigmaPlot versión 12.0. Nas táboas e figuras, os resultados exprésanse como a media dos valores obtidos  $\pm$  desviación estándar.

## 4. Resultados

### 4.1. Efecto do herbicida paraquat sobre o crecemento e o contido celular de pigmentos e proteínas de *C. reinhardtii*

#### *Deseño experimental*

Coa finalidade de determinar os potenciais efectos tóxicos do herbicida paraquat sobre o crecemento e o contido celular de pigmentos e proteínas da microalga doceacuícula *C. reinhardtii*, dispuxéronse unha serie de cultivos expostos a diferentes concentracións de paraquat durante 96 h (Imaxe 4.1.1).



**Imaxe 4.1.1.** Cultivos da microalga *C. reinhardtii* expostos a diferentes concentracións do herbicida paraquat

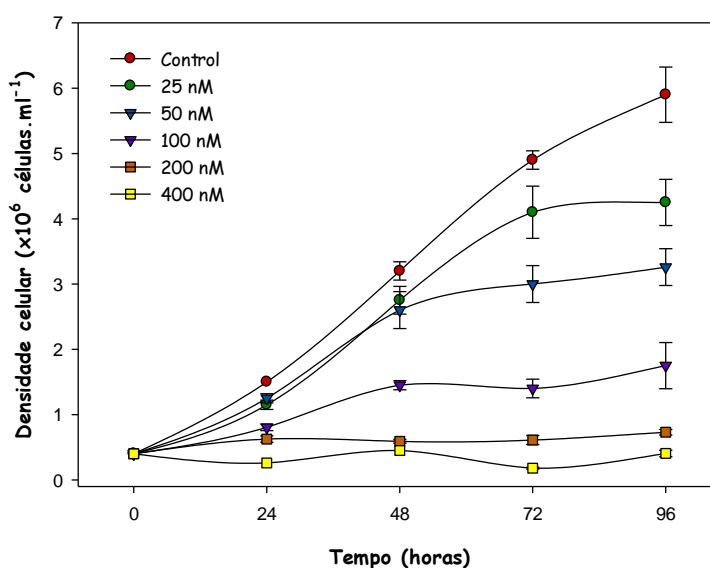
As concentracións do herbicida paraquat ensaiadas foron: 25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM e 400 nM, ademais de cultivos libres de herbicida utilizados como control. Os cultivos microalgais leváronse a cabo por duplicado en botellas PYREX de 250 ml baixo as condicións de temperatura, aireación, iluminación e medio de cultivo descritas en *Material e Métodos*.

Diariamente e ata as 96 horas, tomáronse alícuotas de cada cultivo e procedeuse o recuento celular. Tamén se determinou ás 48 e 96 horas o contido de pigmentos fotosintéticos e proteínas de *C. reinhardtii*, tal e como se describe en *Material e Métodos*.

## Resultados

### Crecedemento

O crecedemento de *C. reinhardtii* vese afectado pola adición do herbicida paraquat ao medio de cultivo, como reflicten as curvas de crecedemento dos cultivos de *C. reinhardtii* expostos a diferentes concentracións do herbicida (Fig. 4.1.1; Táboa 4.1.I).

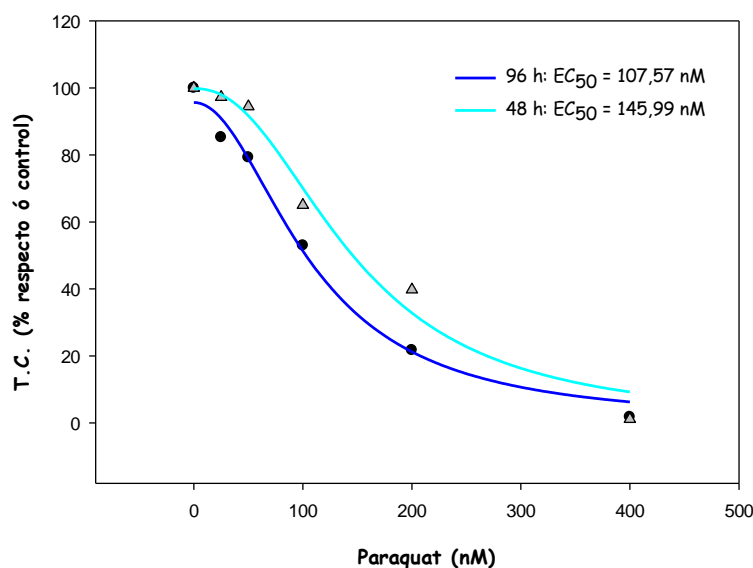


**Figura 4.1.1.** Curvas de crecedemento dos cultivos *C. reinhardtii* expostos a diferentes concentracións de paraquat. Os datos son dados como valores medios dos cultivos replicados  $\pm$  desviacións estándar das medias.

O efecto tóxico do paraquat sobre o crecedemento da microalga detéctase tras 24 horas de exposición ó herbicida, cando todos os cultivos expostos ó paraquat mostran unha densidade celular significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) á observada nos cultivos control (Fig. 4.1.1). Este efecto negativo do paraquat sobre o crecedemento de *C. reinhardtii* obsérvase dende este momento ata o final do período de exposición ás 96 h de ensaio, tal e como revelan tamén as taxas de crecedemento. Ademais, a análise das taxas de crecedemento indican que o efecto inhibitorio do paraquat é dependente da concentración e do tempo de exposición presentando valores menores ó aumentar a concentración de paraquat e o tempo de exposición ó mesmo (Táboa 4.1.I). Nos cultivos coa concentración máis alta ensaiada do herbicida, 400 nM, a taxa de crecedemento mantense por debaixo de  $0,1 \text{ día}^{-1}$  en todo o ensaio indicando que o crecedemento destes cultivos está inhibido ó longo de todo o período de exposición (Táboa 4.1.I).

Concentración paraquat (nM)	T.C. 24h (d <sup>-1</sup> )	T.C. 48h (d <sup>-1</sup> )	T.C. 72h (d <sup>-1</sup> )	T.C 96h (d <sup>-1</sup> )
Control (0)	1,907 ± 0,000	1,429 ± 0,035	1,205 ± 0,014	1,000 ± 0,024
25	1,522 ± 0,089*	1,290 ± 0,056*	1,116 ± 0,083*	0,852 ± 0,030*
50	1,643 ± 0,082*	1,248 ± 0,079*	0,968 ± 0,045*	0,792 ± 0,028*
100	1,008 ± 0,089*	0,929 ± 0,035*	0,601 ± 0,049*	0,529 ± 0,073*
200	0,142 ± 0,011*	0,116 ± 0,022*	0,193 ± 0,057*	0,217 ± 0,021*
400	0,000 ± 0,000*	0,003 ± 0,000*	0,000 ± 0,000*	0,017 ± 0,024*

**Táboa 4.1.I.** Taxas de crecemento obtidas nos cultivos de *C. reinhardtii* expostos a diferentes concentracións de paraquat durante 96 h de exposición. Os datos son dados como valores medios dos cultivos replicados ± desviacións estándar das medias. Diferenzas significativas con respecto ó control a un nivel de significación do 0,05 ( $p < 0,05$ ) son representadas por un asterisco (\*).



**Figura 4.1.2.** Curvas de concentración-resposta que representa o porcentaxe de inibição da taxa de crecemento (T.C.) con respecto ós cultivos control de *C. reinhardtii* fronte diferentes concentracións de paraquat despois de 48 e 96 horas de exposición ó herbicida.

As curvas de concentración-resposta obtidas para o cálculo das  $EC_{50}$  móstranse na figura 4.1.2; as súas funcións matemáticas son:

$$\text{Para as 48 h: } Y = 99,81 / (1 + \exp(- (x - 145,99) / 2,27)); \quad r^2 = 0,99$$

Para as 96 h:  $Y = 95,66 / (1 + \exp(- (x - 107,56) / 2,02))$ ;  $r^2 = 0,99$

O valor de  $EC_{50}$  obtido para *C. reinhardtii* ás 48 h de exposición ó paraquat é significativamente superior ( $p < 0,05$ ) ao valor obtido despois de 96 h de exposición.

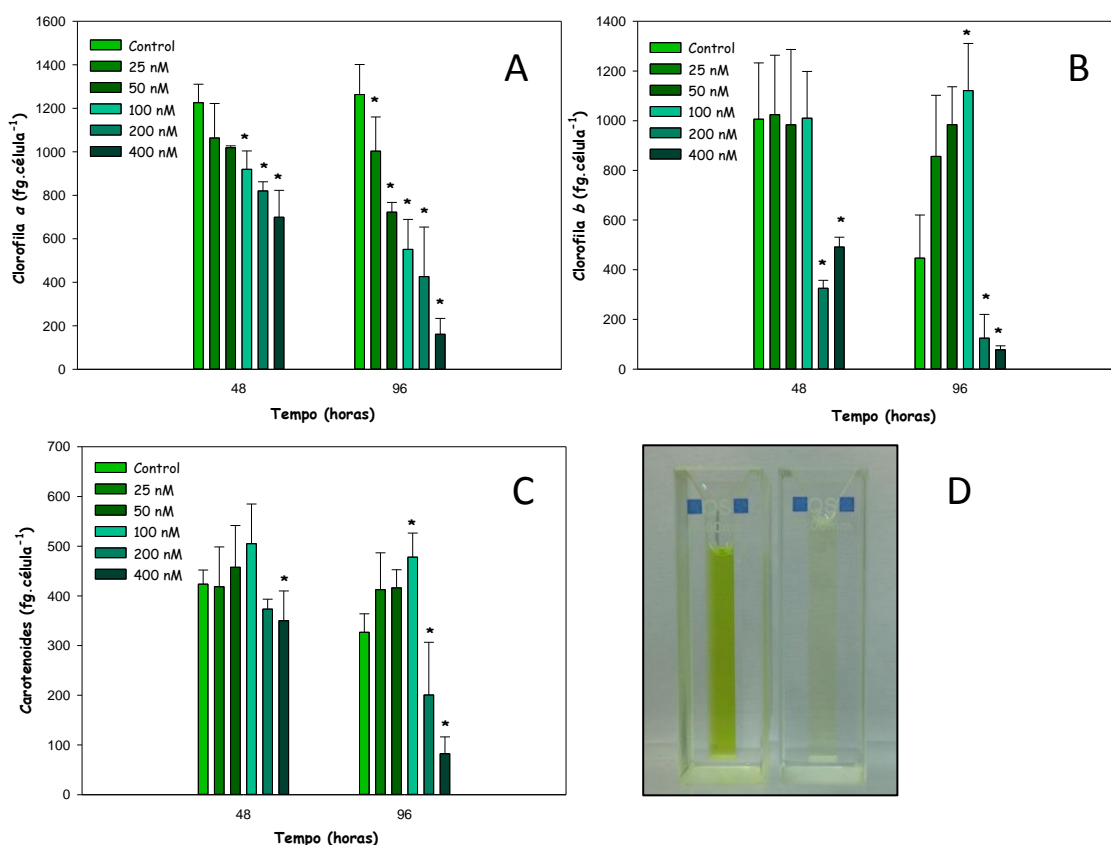
### *Pigmentos fotosintéticos*

A presenza de paraquat nos cultivos de *C. reinhardtii* afecta o seu contido celular de pigmentos fotosintéticos (Fig. 4.1.3).

Tras 48 horas de exposición, o contido celular de clorofila *a* é significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) respecto ó control nos cultivos de *C. reinhardtii* expostos a concentracións superiores a 50 nM (Fig. 4.1.3). Após 96 horas de exposición, a diminución no contido celular de clorofila *a* é significativa ( $p < 0,05$ ) para todas as concentracións ensaiadas e de maneira dependente das mesmas, rexistrándose os valores de clorofila *a* máis baixos nos cultivos expostos ca concentración ensaiada máis alta (Fig. 4.1.3).

O contido celular de clorofila *b*, despois de 48 horas de exposición, presenta valores significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) respecto ó control nos cultivos tratados coas dúas concentracións de paraquat máis altas ensaiadas, 200 e 400 nM (Fig. 4.1.3). Tras 96 horas de exposición, obsérvase un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) no contido celular de clorofila *b* a unha concentración 100 nM (Fig. 4.1.3); nos cultivos expostos ás dúas concentracións máis altas, dáse unha diminución significativa ( $p < 0,05$ ) respecto o control (Fig. 4.1.3).

En canto o contido celular de carotenoides, despois de 48 horas, os cultivos expostos á concentración máis alta ensaiada, 400 nM, mostran unha diminución significativa ( $p < 0,05$ ) no contido celular de carotenoides respecto ó control (Fig. 4.1.3). Tras 96 horas de exposición, os cultivos expostos a unha concentración 100 nM incrementan significativamente o seu contido en carotenoides, mentres que con concentracións superiores de paraquat ten lugar unha redución significativa ( $p < 0,05$ ) respecto o control (Fig. 4.1.3).

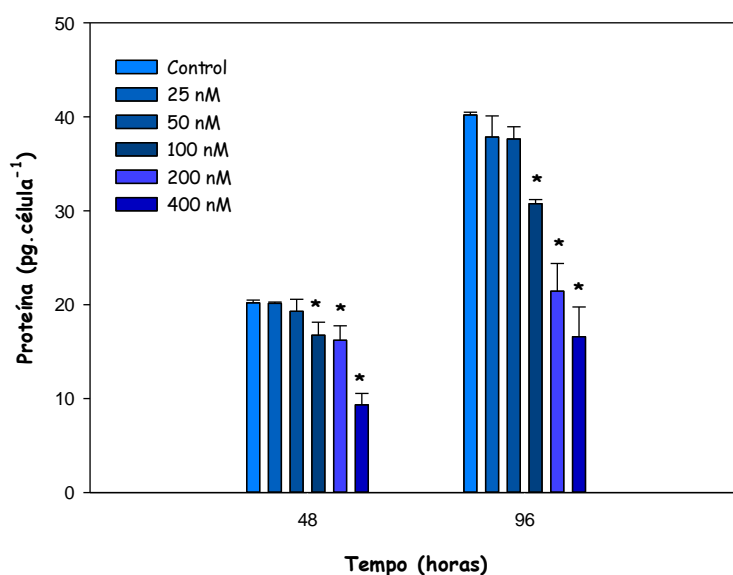


**Figura 4.1.3.** Contido celular de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B) e carotenoides (C) en cultivos de *C. reinhardtii* despois de 48 e 96 de exposición a diferentes concentracións de paraquat. Os datos son dados como valores medios dos cultivos replicados  $\pm$  desviacións estándar das medias. Os asteriscos indican diferenzas significativas con respecto ós valores dos cultivos control ( $p < 0,05$ ). (D) Imaxe representativa dos extractos de pigmentos obtidos a partir de  $3 \times 10^6$  células de *C. reinhardtii* de un cultivo control (cubeta da esquerda) e dun cultivo exposto a 400 nM de paraquat (cubeta da dereita) despois de 96 h de ensaio.

### Proteínas

O contido celular proteico da microalga *C. reinhardtii* vese afectado pola exposición ó herbicida paraquat (Fig. 4.1.4).

Tras 48 horas de exposición, os cultivos tratados con concentracións do praguicida superiores a 50 nM, presentan unha diminución significativa ( $p < 0,05$ ) no contido celular proteico (Fig. 4.1.6) de forma dependente da concentración. Pasadas 96 horas de exposición, obsérvase o mesmo patrón de afectación (Fig. 4.1.4).



**Figura 4.1.4.** Contido celular de proteínas, analizado mediante o método de Bradford, en cultivos de *C. reinhardtii*, despois de 48 e 96 horas de exposición a diferentes concentracións de paraquat. Os datos son dados como valores medios dos cultivos replicados  $\pm$  desviacións estándar das medias. Os asteriscos indican diferenzas significativas con respecto ós valores dos cultivos control ( $p < 0,05$ ).

## 4.2. Efecto do paraquat sobre o crecemento, tamaño, autofluorescencia da clorofila *a* e viabilidade de *C. reinhardtii* en cultivos pre-expostos ó herbicida

### *Deseño experimental*

Co obxectivo de detectar diferenzas no potencial efecto tóxico do paraquat en función de si a microalga *C. reinhardtii* estivo en contacto previo ou non co herbicida, preparouse un cultivo exposto previamente a unha concentración de paraquat de 25 nM, equivalente a  $EC_{10}$ , é dicir, a concentración da sustancia ensaída que provoca unha diminución do crecemento do 10% con respecto ó control, calculada con datos da experiencia previa. Dito cultivo, o cal nomeamos cultivo pre-exposto, mantívose durante un mes, renovando o medio e engadindo de novo a mesma concentración de herbicida cada sete días. En paralelo, tamén se incluíu un cultivo microalgal sen herbicida.



A continuación, cada un dos cultivos utilizouse como inóculo de maneira independente para establecer dúas series de cultivos que se suplementaron con diferentes concentracións de paraquat: 25 nM ( $EC_{10}$ ) e 110 nM (aproximadamente a  $EC_{50}$ ). De este modo a partir do cultivo non pre-tratado preparáronse os seguintes cultivos: Control (0 nM), 25 nM (25nM) e 110 nM (110 nM). A partir do cultivo pre-exposto preparáronse os seguintes cultivos: Control (0 nM<sub>PE</sub>), 25 nM (25 nM<sub>PE</sub>) e 110 nM (110 nM<sub>PE</sub>). Tódolos cultivos leváronse a cabo por duplicado en botellas PYREX de 250 ml e mantivéronse baixo as condicións de temperatura, aireación, iluminación e medio de cultivo descritas en Material e Métodos.

Diariamente e ata as 96 horas, tomáronse alícuotas de cada cultivo e procedeuse ó recuento celular. Tamén, despois de 96 h de ensaio e mediante a técnica de citometría de fluxo, analizáronse diversos parámetros celulares como o tamaño, a autofluorescencia da clorofila *a* e viabilidade celular.

## Resultados

### Crecemento

Según se mostra na táboa 4.2.II, os cultivos da microalga *C. reinhardtii* non pre-expostos presentan unha diminución significativa ( $p < 0,05$ ) na taxa de crecemento respecto ó control ó ser tratados durante 96 horas con concentracións 25 nM e 110 nM do herbicida paraquat.

Concentración paraquat (nM)	T.C. 24h (d <sup>-1</sup> )	T.C. 48h (d <sup>-1</sup> )	T.C. 72h (d <sup>-1</sup> )	T.C 96h (d <sup>-1</sup> )
0 nM	1,23 ± 0,06	1,70 ± 0,02	1,22 ± 0,01	1,01 ± 0,02
25 nM	0,99 ± 0,01*	1,31 ± 0,02*	1,08 ± 0,02*	0,89 ± 0,01*
110 nM	0,42 ± 0,05*	0,48 ± 0,03*	0,68 ± 0,06*	0,67 ± 0,03*

**Táboa 4.2.II.** Taxas de crecemento obtidas nos cultivos de *C. reinhardtii* non pre-expostos e tratados con concentracións de paraquat correspondentes a  $EC_{10}$  (25 nM) e  $EC_{50}$  (110 nM) durante 96 h. Os datos son dados como valores medios dos cultivos replicados ± desviacións estándar das medias. Diferenzas significativas con respecto ó control a un nivel de significación do 0,05 ( $p < 0,05$ ) son representadas por un asterisco (\*).

En canto os cultivos da microalga pre-expostos, a taxa de crecemento solo se ve afectada nos cultivos expostos a unha concentración 110 nM (110 nM<sub>PE</sub>) de paraquat tras 24 e 48 horas de exposición, diminuíndo significativamente ( $p < 0,05$ ) con respecto ó control (0 nM<sub>PE</sub>) (Táboa. 4.2.III).

Concentración paraquat (nM)	T.C. 24h (d <sup>-1</sup> )	T.C. 48h (d <sup>-1</sup> )	T.C. 72h (d <sup>-1</sup> )	T.C 96h (d <sup>-1</sup> )
0 nM <sub>PE</sub>	1,21 ± 0,01	1,59 ± 0,05	1,19 ± 0,02	1,02 ± 0,00
25 nM <sub>PE</sub>	1,16 ± 0,05	1,48 ± 0,06	1,06 ± 0,07	1,02 ± 0,01
110 nM <sub>PE</sub>	0,54 ± 0,03*	0,85 ± 0,00*	1,04 ± 0,01	0,93 ± 0,02

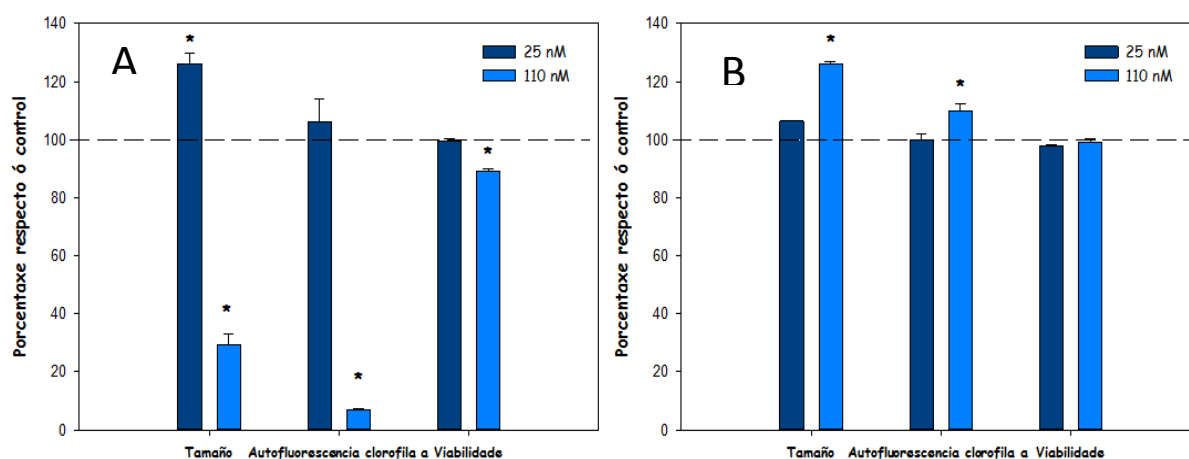
**Táboa 4.2.III.** Taxas de crecemento obtidas nos cultivos de *C. reinhardtii* pre-expostos cunha concentración 25 nM de paraquat e tratados posteriormente coas concentracións correspondentes a EC<sub>10</sub> (25 nM<sub>PE</sub>) e EC<sub>50</sub> (110 nM<sub>PE</sub>) durante 96 h. Os datos son dados como valores medios dos cultivos replicados ± desviacións estándar das medias. Diferenzas significativas con respecto ó control a un nivel de significación do 0,05 ( $p < 0,05$ ) son representadas por un asterisco (\*).

#### *Tamaño celular e autofluorescencia da clorofila a*

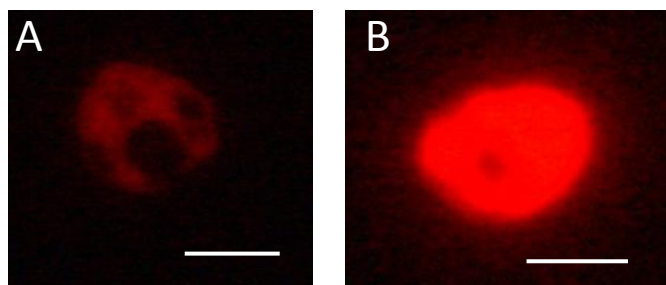
Nos cultivos de *C. reinhardtii* non pre-expostos, o tamaño celular aumenta significativamente ( $p < 0,05$ ) respecto ó control cando son expostos durante 96 horas a unha concentración de 25 nM, mentres que diminúe de forma significativa ( $p < 0,05$ ) cunha concentración 110 nM (Fig. 4.2.1). Nos cultivos pre-tratados e expostos a continuación con concentracións correspondentes a EC<sub>50</sub> (110 nM<sub>PE</sub>) e EC<sub>10</sub> (25 nM<sub>PE</sub>) durante 96 horas, ten lugar un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) do tamaño celular a unha concentración do praguicida 110 nM, respecto ó control (Fig. 4.2.1). En canto a autofluorescencia celular emitida pola clorofila *a*, os cultivos non tratados mostran unha diminución significativa da mesma ( $p < 0,05$ ), respecto ó control 0 nM, ao ser expostos durante 96 horas cunha concentración 110 nM (Fig. 4.2.1). En contra, nos cultivos previamente pre-tratados e expostos a esa mesma concentración, 110 nM<sub>PE</sub>, a fluorescencia celular aumenta significativamente ( $p < 0,05$ ) respecto ó control (Fig. 4.2.1).

## Viabilidade celular

A viabilidade celular vese tamén claramente afectada nos cultivos expostos ó paraquat. Tras 96 horas de exposición cunha concentración 110 nM, nos cultivos non tratados prodúcese unha redución significativa ( $p < 0,05$ ) da viabilidade celular respecto ó control (Fig. 4.2.1). Nos cultivos pre-expostos co praguicida, as células non experimentan cambios significativos na súa viabilidade con ningunha das dúas concentracións ensaiadas (Fig. 4.2.1).



**Figura 4.2.1.** Tamaño celular, autofluorescencia da clorofila *a* e viabilidade celular analizados por citometría de fluxo en cultivos de *C. reinhardtii* non pre-expostos (A) e en cultivos de *C. reinhardtii* pre-expostos a 25 nM do paraquat (B) e posteriormente tratados coas concentracións correspondentes a  $EC_{10}$  (25 nM) e  $EC_{50}$  (110 nM) despois de 96 h. Os resultados exprésanse como o porcentaxe dos valores obtidos por CMF con respecto ó control. O valor do control represéntase por unha liña descontinua. Diferenzas significativas con respecto ó control a un nivel de significación do 0,05 ( $p < 0,05$ ) son representadas por un asterisco (\*).



**Figura 4.2.2.** Autofluorescencia da clorofila *a* en células de *C. reinhardtii* despois de 96 h de exposición a 110 nM a partir dun cultivo inóculo non pre-exposto ó herbicida (A; 110 nM) e dun cultivo inóculo pre-exposto ó paraquat (B; 110 nM<sub>PE</sub>). As barras indican 5  $\mu\text{m}$ . As imaxes foron tomadas nun microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400, con excitación a 450-490 nm.

## 5. Discusión

O paraquat é un herbicida bupiridílico que actúa a nivel do fotosistema I do cloroplasto, inducendo a formación de ións superóxido e outras especies radicais de oxíxeno. Debido ao mecanismo de acción, este herbicida pode afectar negativamente a numerosos produtores primarios, como as microalgas, considerándose así a súa presenza en medios acuáticos como un potencial risco para o medioambiente.

Un dos parámetros máis utilizados nos ensaios de toxicidade en microalgas é o crecemento. No presente estudo, o crecemento da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* é afectado polo paraquat dunha forma dependente da concentración do herbicida no medio. Os resultados obtidos mostraron unha diminución significativa na taxa de crecemento dos cultivos microalgais expostos durante ás 96 horas de ensaio e a todas as concentracións ensaiadas (Táboa 4.1.I). Este mesmo efecto negativo foi observado en outras especies de microalgas de auga doce, como *Chlamydomonas moewusii* exposta a concentracións de paraquat iguais ou superiores a 50 nM (Prado *et al.*, 2009), ou *Scenedesmus quadricauda* exposta a concentracións iguais ou superiores a 0,02 mg l<sup>-1</sup> (Wong, 2000). A inhibición do crecemento tamén describiuse en outras especies como *Chlorella vulgaris* ou *Anabaena doliolum* que foron tratadas con outro tipo de herbicidas (Mohapatra e Mohanty, 1992; Rioboo *et al.*, 2002).

A interpolación gráfica despois da determinación da relación concentración-resposta no presente estudo revelou un valor de EC<sub>50</sub> despois de 96 h de exposición de 107, 57 nM. Valores de EC<sub>50</sub> descritos para o paraquat en microalgas en estudos anteriores varían dende 778 nM nun ensaio de inhibición de crecemento de 96 h en *Chlorella vulgaris* (Ma *et al.*, 2002) a 30 mM nun ensaio de inhibición de crecemento tamén de 96 h levado a cabo na microalga *Selenastrum capricornutum* (Sáenz *et al.*, 1997). O valor EC<sub>50</sub> calculado no presente estudo aproxímase mellor ós valores obtidos por Prado *et al.* (2009), que describiu unha EC<sub>50</sub> de 110 nM utilizando como organismo de ensaio outra especie do xénero *Chlamydomonas*, *C. moewusii*. Este dato suxire que ambas especies terían unha sensibilidade similar ó efecto deste herbicida. Por outro lado, o feito de que a EC<sub>50</sub> despois de 96 h de ensaio presente valores inferiores ós obtidos ás 48 h indicaría que o efecto do paraquat é máis agudo a medida que se incrementa o tempo de exposición.

A presenza do paraquat provoca tamén cambios na composición bioquímica da microalga *C. reinhardtii* (Fig. 4.1.3 e 4.1.4). Os pigmentos fotosintéticos son afectados pola exposición ó herbicida despois de 48 e 96 horas. Estas alteracións foron xa observadas en outros estudos realizados (Franqueira *et al.*, 1999; Rioboo *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2009). As células sofren un decrecemento no contido celular da clorofila *a* que é máis notable ó incrementar a concentración do herbicida (Fig. 4.1.3). A redución no contido en clorofila celular pode deberse ó mecanismo de acción do paraquat, que provocaría a súa degradación oxidativa (Kirtikara e Talbot, 1996). A clorofila *b* e os carotenoides totais sofren tamén unha diminución significativa tras 96 horas de exposición coas concentracións de paraquat máis altas (200 e 400 nM), mentres que a concentracións inferiores ten lugar un incremento do seu contido celular (Fig. 4.1.3), podendo considerarse isto como un mecanismo de tolerancia celular ó herbicida (François e Robinson, 1990). En outras microalgas, como *Chlamydomonas eugametos*, observouse este mesmo efecto trala exposición ó paraquat, detectándose a inhibición dos carotenoides a concentracións máis elevadas que no caso da clorofila (Franqueira *et al.*, 1999).

O contido celular proteico tamén se atopa afectado en *C. reinhardtii* como consecuencia da exposición ó herbicida, diminuíndo respecto ó control cunha concentración igual ou superior a 100 nM (Fig. 4.1.4). En outros estudos realizados, cultivos de *C. moewusii* expostos ó paraquat manifestaron drásticos decrecementos no contido proteico (Prado *et al.*, 2011). Este descenso pode ter a súa causa na alteración da estrutura das proteínas por fortes degradacións oxidativas provocadas polos radicais libres de osíxeno (ROS) xerados pola acción do paraquat (Davies, 1987).

Co fin de estudar potenciais fenómenos de aclimatación de *C. reinhardtii* fronte a toxicidade do paraquat, mantivéronse cultivos expostos a un concentración de paraquat correspondente a  $EC_{10}$ . Posteriormente estes cultivos expuxéronse a dúas concentracións do herbicida, correspondentes ós valores da  $EC_{10}$  e  $EC_{50}$  obtidos na primeira experiencia durante 96 horas. Ao mesmo tempo, efectuouse unha comparativa con cultivos que non estiveron en contacto previo co paraquat. Nestes cultivos deuse unha redución da taxa de crecemento significativa respecto ó control debido os efectos tóxicos do herbicida (Táboa 4.2.II), en concordancia con resultados obtidos na experiencia de crecemento (Táboa 4.1.I). En contra, nos cultivos pre-expostos ó paraquat o efecto tóxico diminuíu, de maneira que a taxa de

crecemento decreceu respecto ó control só en cultivos expostos á  $EC_{50}$ , 110 nM<sub>PE</sub>, durante as primeiras 48 horas (Táboa 4.2.III).

Mediante a citometría de fluxo analizáronse diversos parámetros celulares que poden utilizarse como indicadores de toxicidade, como o tamaño das células, autofluorescencia da clorofila *a* e a viabilidade celular. As células de *C. reinhardtii* expostas ó paraquat con concentracións correspondentes a  $EC_{50}$ , 110 nM, durante 96 horas, mostraron unha redución do tamaño respecto ós cultivos control sen o herbicida (Fig. 4.2.1). Isto pode estar relacionado ca elevada diminución da taxa de crecemento ocasionada pola acción do paraquat neses cultivos, como ocorre en outros estudos realizados (Franqueira *et al.*, 1999). Sen embargo, as células expostas a concentración de paraquat 25 nM mostraron un incremento significativo do tamaño celular con respecto ás células control (Fig. 4.2.1). Isto podería deberse a formación de estruturas palmeloides pola incapacidade das células de remata-la división celular, así como fallos na regulación do volume celular debido a alteración das membranas, tal e como describiron outros autores (Bray *et al.*, 1993; Franqueira *et al.*, 1999). En canto, os cultivos pre-expostos ó paraquat, o tamaño das células foi significativamente maior respecto ó control só a unha concentración 110 nM<sub>PE</sub> (Fig. 4.2.1).

Tamén se detecta nas células en presenza do paraquat, un descenso na autofluorescencia da clorofila *a* (Fig. 4.2.1 e 4.2.2). Isto coincide co ocorrido en outros xéneros de *Chlamydomonas* afectadas polo paraquat (Franqueira *et al.*, 1999). Ademais correspóndese co observado neste estudo con respecto ó contido celular de clorofila. En cambio, en cultivos pre-expostos, a autofluorescencia da clorofila *a* incrementábase significativamente respecto ó control (Fig. 4.2.1 e 4.2.2).

A análise da viabilidade celular mediante o citómetro de fluxo con DAF mostra un descenso significativo da porcentaxe de células metabolicamente activas naqueles cultivos tratados a unha concentración 110 nM durante 96 horas (Fig. 4.2.1). Os radicais libres de osíxeno (ROS) orixinados pola acción do paraquat, poden provocar a peroxidación lipídica da membrana celular ocasionando a perda da integridade da mesma e causando danos en enzimas esenciais no funcionamento celular, como son as esterases; isto concorda cos resultados obtidos. Por outra banda, nos cultivos tratados previamente co herbicida, a viabilidade celular non se veu afectada en ningún momento ca exposición ó herbicida (Fig. 4.2.1).

Unha hipótese a estas diferenzas fronte ó efecto tóxico do paraquat entre os cultivos pre-expostos ó herbicida e aqueles que non estiveron en contacto previo co mesmo, sería a indución en *C. reinhardtii* de certas adaptacións fisiolóxicas que aumentarían a tolerancia desta microalga ante o efecto tóxico do herbicida. Traballos realizados coa microalga *C. moewusii* describen a estimulación xeral do seu metabolismo inducida pola presenza do paraquat (Prado *et al.*, 2009). Ademais, a pre-exposición a este herbicida pode activar mecanismos de destoxificación celular, enzimáticos ou non enzimáticos (Franqueira *et al.*, 1999), que podería explicar as diferenzas observadas nos cultivos pre-expostos. En outros estudos realizados, observouse que microalgas como *C. reinhardtii* resistentes ó paraquat, presentan enzimas antioxidantes como a superoxidasa dimutasa, e outros antioxidantes, cuxo incremento no citosol está relacionado ca aparición de lesións oxidativas (Vartak e Bhargava, 1999). O incremento mediado polo paraquat no contido citosólico de antioxidantes foi tamén documentado por outros autores como Donahue *et al.* (1997).

### *Conclusiones*

No presente estudo compróbase que o herbicida paraquat provoca alteracións significativas sobre a microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, afectando ó crecemento e ó contido celular de pigmentos fotosintéticos e de proteínas. Ademais a pre-exposición da microalga ó paraquat diminúe o efecto negativo do herbicida cando *C. reinhardtii* se expón a novos aportes deste praguicida. Isto podería indicar que a exposición ó paraquat induce en *C. reinhardtii* certas adaptacións fisiolóxicas que aumentan a tolerancia desta microalga ante o efecto tóxico do herbicida, particularmente sobre parámetros como o crecemento, autofluorescencia da clorofila *a* e a viabilidade celular dos cultivos.

## 6. Bibliografía

Baltazar, T., Dinis, R. J., Duarte, J. A., Bastos, M. L. e Carvalho, F. (2013). Paraquat research: do recent advances in limiting its toxicity make its use safer?. *British Journal of Pharmacology*, 168: 44-45.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

Bray, D. F., Bagu, J. R. e Nakamura, K. (1993). Ultrastructure of *Chlamydomonas reinhardtii* following exposure to paraquat: comparison of wild type and a paraquat-resistant mutant. *Can. J. Bot.*, 71: 174-182.

Carter, N. P. e Meyer, E. W. (1990). Introduction to the principles of flow cytometry. En: *Flow Cytometry. A Practical Approach*. Ormerod, M. G. (Ed.). Oxford: Oxford University Press. pp. 1-28.

Davies, K. J. A. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biochem. Chem.*, 262: 9895-9901.

De Lorenzo, M. E., Taylor, L. A., Lund, S. A., Pennington, P. L., Stroizer, D. E. e Fulton, M. H. (2002). Toxicity and bioconcentration potential of the agricultural pesticide endosulfan in phytoplankton and zooplankton. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 81: 159-167.

Deneer, J. W. (2000). Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. *Pest. Manage. Sci.*, 56: 516-520.

Donahue, J. L., Okpodu, C. M., Cramer, C. L., Grabau, E. A. e Alscher, R. G. (1997). Response of antioxidants to paraquat in pea leaves. Relationships to resistance. *Plant Physiol.*, 113: 249.

François, D. L. e Robinson, G. G. C. (1990). Indices of triazine toxicity in *Chlamydomonas geitleri*. *Aquat. Toxicol.*, 16: 205-228.

Franqueira, D., Cid, A., Torres, E., Orosa, M. e Herrero, C. (1999). A comparison of the relative sensitivity of structural and functional celular responses in the alga *Chlamydomonas eugametos* exposed to the herbicide paraquat. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 36: 264-269.

Haglund, K. (1997). The use of algae in aquatic toxicity assessment. En: *Progress in Phycological Research*, 12. Round, F. E. e Chapman, D. J. (Eds.). England: Bristol. pp. 181-212.

Harris, E. (2009). *The Chlamydomonas Sourcebook. Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use* (Volume I). Oxford: Eslevier. pp. 480.



- Hela, D. G., Lambropoulou, D. A., KA, K., e Albanis, T. A. (2005). Environmental monitoring and ecological risk assessment for pesticide contamination and effects in Lake Pamvotis, northwestern Greece. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24: 1548-1556.
- Hörnström, E. (1990). Toxicity test with algae-a discussion on the batch method. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 20: 343-353.
- Jansen, M. K. A., Shaaltiel, Y., Kazzes, D., Canaani, O., Malkin, S. e Gressel, J. (1989). Increased tolerance to the photoinhibitory light in paraquat resistant *Conyza bonariensis* measured by photoacoustic spectroscopy and  $^{14}\text{C}_2$  fixation. *Plant Physiol.*, 91: 1174.
- Jeffrey, S. W. e Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*, and  $c_2$  in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 167: 191-194.
- Jung, I. L. e Kim, I. G. (2003). Thiamine protects against paraquat-induced damage: scavenging activity of reactive oxygen species. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 15: 19-26.
- Katsumata, H., Kaneco, S., Suzuki, T. e Ohta, K. (2006). Determination of atrazine and simazine in water samples by high-performance liquid chromatography after preconcentration with heat-treated diatomaceous earth. *Anal. Chim. Acta.*, 577: 214-219.
- Kirtikara, K. e Talbot, D. (1996). Alteration in protein accumulation gene expression and ascorbate-glutathione pathway in tomato *Lycopersicon esculentum* under paraquat and ozone stress. *J. Plant Physiol.*, 148: 752-760.
- Ma, J., Xu, L., Wang, S., Zheng, R., Jin, S., Huang, S. e Huang, Y. (2002). Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 51: 128-132.
- Mayer, P., Cuhel, R. e Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Res.*, 31: 25-31.
- Mohapatra, P. K. e Mohanty, R. C. (1992). Growth pattern changes of *Chlorella vulgaris* and *Anabaena doliolum* due to toxicity of dimethoate and endosulfan. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 576-581.
- Moreno, M. D. (2003). *Toxicología Ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana*. García, A. (Ed.). Madrid: McGRAW-Hill. pp. 370.
- Mullaney, P. F., Van Dilla, M. A. e Coulter, J. R. (1969). Cell sizing: a light scattering photometer for rapid volume determination. *Rev. Sci. Instrum.*, 40: 1029-1034.
- Powles, S. B. e Cornic, G. (1987). Mechanism of paraquat resistance in *Hordeum glaucum* I. Studies on isolated organelles and enzymes. *Aust. J. Plant Physiol.*, 14: 81

- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C. e Cid, A. (2009). The herbicide paraquat induces alterations in the elemental and biochemical composition of non-target microalgal species. *Chemosphere*, 76: 1440-1444.
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Abalde, J. e Cid, A. (2009). Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat. *Environ. Int.*, 35: 240-247.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Suárez, P. e Cid, A. (2011). Flow cytometric analysis to evaluate physiological alterations in herbicide-exposed *Clamydomonas moewusii* cells. *Ecotoxicology*, 21: 409-420.
- Rioboo, C., González, O., Herrero, C. e Cid, A. (2002). Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. *Aquat. Toxicol.*, 59: 225-235.
- Rioboo, C., Prado, R., Herrero, C. e Cid, A. (2007). Population growth study of the rotifer *Brachionus* sp. fed with triazine-exposed microalgae. *Aquat. Toxicol.*, 83: 247-253.
- Sáenz, M. E., Alberdi, J. L, Di Marzio, W. D., Accorinti, J. e Tortorelli, M. C. (1997). Paraquat toxicity to different green algae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58: 922-928.
- Santos, S. F. M., Schaule, G., Alves, A. e Madeira, M. L. (2013). Adsorption of paraquat herbicide on deposits from drinking water networks. *Chemical Engineering Journal*, 229: 324-333.
- Shaaltiel, Y. e Gressel, J. (1986). Multienzyme oxygen radical detoxification system correlated with paraquat resistance in *Conyza bonariensis*. *Pest. Biochem. Physiol.*, 26: 22.
- Strickland, J. D. e Parsons, T. R. (1972). A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada, bull., 167.
- Suntres, Z. E. (2002). Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology*, 180: 65-77.
- Tomlin, C. (2003). *The Pesticide Manual. A world Compendium*. Hampshire: BCPC (British Crop Protection Council). pp. 1341.
- Vartak, V. e Bhargava, S. (1999). Photosynthetic Performance and Antioxidant Metabolism in a Paraquat-Resistant Mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 64: 9-15.
- Warren, N., Allan, I. J., Carter, J. E., House, W. A. e Parker, A. (2003). Pesticides and other microorganic contaminants in freshwater sedimentary environments-A review. *Appl. Geochem.*, 18: 159-194.
- Wong, P. K. (2000). Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere*, 41: 177-188.

Zhou, Q., Mao, J., Xiao, J. e, Xie, G. (2010). Determination of paraquat and diquat preconcentrated with N doped TiO<sub>2</sub> nanotubes solid phase extraction cartridge prior to capillary electrophoresis. *Anal. Methods*, 2: 1063-1068.

## Abreviaturas

<b>CCAP</b>	<b>Colección de Cultivos de Algas e Protozoos</b>
<b>CMF</b>	<b>Citometría de flujo</b>
<b>DAF</b>	<b>Diacetato de fluoresceína</b>
<b>DMSO</b>	<b>Dimetilsulfóxido</b>
<b>EC<sub>50</sub></b>	<b>Concentración Efectiva 50 ou Media</b>
<b>EC<sub>10</sub></b>	<b>Concentración Efectiva 10</b>
<b>FL</b>	<b>Fluorescencia</b>
<b>FS</b>	<b>Luz reflectada nun ángulo &lt; 20°</b>
<b>HPLC</b>	<b>Cromatografía líquida de alta eficacia</b>
<b>ROS</b>	<b>Especies reactivas de osíxeno</b>
<b>SS</b>	<b>Luz reflectada no ángulo lateral</b>
<b>TAP</b>	<b>Tris Acetato Fosfato</b>
<b>T.C.</b>	<b>Taxa de crecemento</b>
<b>u.a</b>	<b>Unidades arbitrarias</b>
<b>PBS</b>	<b>Tampón fosfato salino</b>