

Efecto tóxico de un herbicida frecuente en Galicia sobre una microalga dulceacuícola

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

Eduardo Casais Caamaño
A Coruña, 2014



Índice

Resumen	4
1. Introducción	5
2. Objetivo	6
3. Materiales y métodos	6
3.1 Descripción de la especie utilizada	6
3.2 Herbicida	7
3.3 Cultivo microalgal	7
3.4 Determinación de la densidad celular	7
3.5 Determinación espectrofotométrica de pigmentos	8
3.6 Determinación de proteínas hidrosolubles	9
3.7 Análisis de la actividad celular	9
3.8 Diseño experimental	10
3.9 Análisis estadístico	10
4. Resultados y discusión	11
4.1 Determinación de la densidad inicial	11
4.2 Crecimiento	12
4.3 Pigmentos	15
4.4 Proteínas	17
4.5 Actividad celular	18
4.6 Influencia del aumento de la temperatura sobre la toxicidad del herbicida glifosato	19
5. Conclusiones	20
6. Bibliografía	22

Resumen

Los herbicidas son uno de los compuestos químicos de origen antrópico con mayor impacto en los ecosistemas dulceacuícolas. Por ello, los estudios de ecotoxicidad de los herbicidas son fundamentales de cara a proteger y conservar estos ecosistemas.

En este trabajo se estudió el efecto tóxico del glifosato sobre la microalga dulceacuícola *Scenedesmus quadricauda*. La toxicidad del glifosato se evaluó mediante el estudio del crecimiento durante un periodo de hasta 144 horas, no encontrándose diferencias significativas ($p < 0'1$) entre los controles sin glifosato y los tratamientos con herbicida (10, 20 y 40 mg L⁻¹). También se observó una importante alteración de la estructura de las células. El contenido en pigmentos mostró una importante reducción a nivel de clorofila *a* con concentraciones de 40 mg L⁻¹ de glifosato, mientras que el contenido celular de proteínas se vio estimulado a concentraciones de 20 mg L⁻¹ de glifosato. Mediante el protocolo utilizado para determinar la actividad celular se observó una inhibición de dicha actividad; sin embargo, mediante microscopía de epifluorescencia se observó que las células expuestas a cualquiera de las concentraciones del herbicida ensayadas permanecen activas. Por último se estudió la posible influencia de un cambio ambiental, como es el aumento de la temperatura, sobre la toxicidad del glifosato, observándose una mayor sensibilidad de las células de *S. quadricauda* ante el glifosato.

1. Introducción

Los sistemas dulceacuícolas captan gran diversidad de productos químicos producidos por la actividad humana, los cuales, pueden tener diversos efectos tóxicos sobre la biota de estos ecosistemas. Las aguas residuales producidas por la agricultura suelen mostrar altas concentraciones de herbicidas (Fenoll *et al.*, 2014; Mallmann *et al.*, 2013), que terminan alcanzando los sistemas dulceacuícolas y tienen un gran impacto sobre los organismos que viven en estos ambientes (Fargasova, 1994a; Giesy *et al.*, 2000), en especial sobre los productores primarios (Fargasova, 1994b; Ma *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2004).

Estos herbicidas afectan en especial a las microalgas dulceacuícolas (Sáenz & Di Marzio, 2009; Sáenz *et al.*, 1997), y algunas de ellas se utilizan como bioindicadores del estado de estos ecosistemas (Boyle, 1984) y son utilizadas en ensayos biológicos de toxicidad (Haglund, 1997). Estos microorganismos son elegidos para los estudios de toxicidad debido a su importancia en los ecosistemas como la base de las cadenas tróficas acuáticas y a su papel esencial en el reciclaje de nutrientes en todos los ambientes (Källqvist & Svenson, 2003; Sabater & Carrasco, 2001).

La toxicidad de estos herbicidas puede afectar a las microalgas inhibiendo o limitando su crecimiento, la fotosíntesis, la síntesis de pigmentos fotosintéticos o induciendo la clorosis. En algunos casos, a concentraciones bajas del herbicida, el crecimiento puede verse estimulado (Albarracín *et al.*, 2011; Prado *et al.*, 2009; Prado *et al.*, 2011; Wong, 2000). Además, debe tenerse en cuenta que la persistencia de los herbicidas en el agua dulce (Tsui & Chu; 2008), en especial en las zonas con alta presencia de metales quelantes, tiene como resultado que los organismos estén expuestos a este tóxico durante periodos de tiempo considerables.

La mayoría de los estudios de toxicidad que se realizan suelen centrarse en los efectos inmediatos y a corto plazo de los contaminantes sin tener en cuenta las posibles implicaciones que tendrán estos contaminantes a largo plazo. Teniendo en cuenta que la temperatura es una de las condiciones ambientales que más influye sobre los organismos, el cambio climático y el aumento de temperatura que conllevara, afectará a los organismos (Walther *et al.*, 2002) e influirá en los efectos tóxicos de los herbicidas sobre las microalgas dulceacuícolas, pudiendo modificar su grado de toxicidad (Manciocco *et al.*, 2014).

La necesidad actual de proteger y conservar el medio natural y toda su biota, da como resultado que los estudios de toxicidad sean imprescindibles para determinar los posibles efectos perjudiciales, a corto y largo plazo, que puedan tener los diversos productos químicos de origen antrópico que llegan a estos ecosistemas.

2. Objetivo

El objetivo general de este trabajo es evaluar el potencial efecto tóxico del glifosato, principio activo de algunos herbicidas no selectivos, sobre la microalga dulceacuícola *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brebisson, a nivel de crecimiento, composición bioquímica y actividad celular.

Además se pretende evaluar las posibles implicaciones que tendría un aumento de la temperatura sobre la toxicidad del glifosato sobre *S. quadricauda*, de tal forma que se pueda predecir la posible influencia del cambio climático.

3. Materiales y métodos

3.1. Descripción de la especie utilizada

En el estudio se empleó la especie de agua dulce *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brebisson, la cual se clasifica en la clase *Chlorophyceae*, dentro de la división *Chlorophyta*.

Esta especie presenta células cilíndricas aisladas y rectangulares (las del centro) y un poco convexas (las externas) cuando forma cenobios de 4 células. Las células externas poseen dos espinas de longitud similar a la de la célula, y que se proyectan hacia afuera en ángulo de 45 grados (Ortega-Mayogoitia & Rojo, 2000). Con frecuencia, las células se agrupan en cenobios de cuatro u ocho células, los cuales se forman dentro de la pared de la célula madre y se liberan para formar una nueva colonia o dispersar como organismos unicelulares independientes. La morfología de las células y la formación de las espinas se ve determinada por las variaciones de las condiciones químicas del medio en el que se encuentran (Shubert & Trainor, 1974).

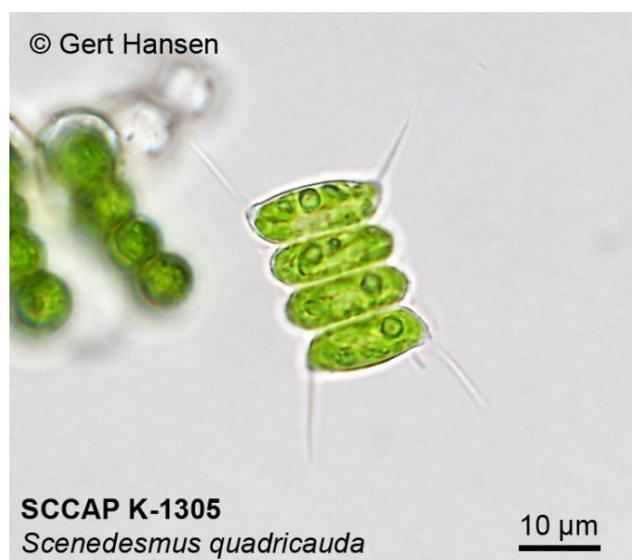


Figura 1. Fotografía de *Scenedesmus quadricauda*. Tomada de: <http://nordicmicroalgae.org/taxon/Scenedesmus%20quadricauda>.

S. quadricauda es una especie indicadora de ambientes eutróficos (Rosenström & Lepistö, 1996) y presenta una amplia distribución en toda España (Cambra *et al.*, 1998).

3.2. Herbicida

El glifosato (N-fosfonometil-glicina; $C_3H_8NO_5P$) es el principio activo más empleado en los herbicidas no selectivos de amplio espectro. Salazar *et al.* (2011) determinaron que el glifosato suprime la capacidad de generar aminoácidos aromáticos, bloqueando la enzima enolpiruvilsiquimato-3-fosfosintasa (EPSPS) que se encuentra normalmente dentro de los cloroplastos. El glifosato también tienen importantes efectos sobre el crecimiento, la capacidad reproductiva, la fotosíntesis y la síntesis de clorofila *a* de las plantas afectadas (Wong, 2000).

El glifosato utilizado en el estudio es un estándar químico (grado PESTANAL de Fluka Analytical) con una riqueza del 99'9% y comercializado por Sigma-Aldrich.

En las diferentes experiencias se utilizan diferentes concentraciones de glifosato que se preparan a partir de una solución *stock* estéril en agua muy concentrada.

3.3. Cultivo microalgal

Los cultivos de *S. quadricauda* se realizan en medio Bristol (Brown *et al.*, 1967), preparado a partir de una solución acuosa de macroelementos, y otra de oligoelementos. Ambas soluciones se esterilizan en autoclave. Posteriormente se mezclan en condiciones de esterilidad y se almacena refrigerado a 4 °C.

Los cultivos *stock* se realizan en botellas Pyrex de 1 L y se mantienen con aireación en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas de luz y temperatura. La iluminación, de $68.25 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$, es proporcionada por tubos fluorescentes Philips TLD de 36 W y aplicada con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La temperatura se mantiene constante a 18 ± 1 °C para la primera experiencia, mientras que para la segunda experiencia la temperatura es de 22 ± 1 °C. El aire inyectado a los cultivos es filtrado mediante filtros Millipore FG de 0'20 μm de tamaño de poro.

3.4. Determinación de la densidad celular

Se determinó la densidad celular, por medio de recuentos al microscopio óptico utilizando una cámara Neubauer, cada 24 horas, empleando una alícuota de cada uno de los cultivos y utilizando un microscopio óptico de contraste de fases NIKON

Labophot. A partir de estos datos, se calculó la tasa de crecimiento (μ) y el porcentaje de inhibición del crecimiento algal:

$$\text{Ecuación 1: } \mu = (\ln (N_f) - \ln (N_0)) / \ln 2 (t_f - t_0)$$

Dónde μ es la tasa de crecimiento expresada en días⁻¹, (t_0) y (t_f) son el tiempo inicial y final del periodo estudiado, ambos expresados en días, y (N_0) y (N_f) son el número de células por mL⁻¹ en dichos tiempos.

$$\text{Ecuación 2: } \% \text{ inhibición} = (C-T)/C \cdot 100$$

Dónde (C) y (T) son el número de células mL⁻¹ del control y de cada tratamiento.

El cálculo de la Concentración Efectiva 50 para el crecimiento (EC 50, concentración que reduce en un 50% un parámetro) se lleva a cabo a las 96 horas mediante interpolación gráfica (Walsh et al., 1987).

3.5. Determinación espectrofotométrica de pigmentos

Para el análisis espectrofotométrico del contenido en clorofilas y carotenoides de *S. quadricauda*, se recogen las células por centrifugación de un volumen determinado de cultivo en una centrífuga refrigerada ALC PK121R a 8000 g durante 20 minutos a 4 °C. Se retira el sobrenadante y la biomasa se resuspende en un volumen conocido de acetona:metanol (2:1). Se mantienen de este modo durante 24 horas a 4 °C y en oscuridad para que la extracción sea completa. Tras este tiempo, se centrifuga de nuevo para retirar los restos celulares y se recoge el sobrenadante que contiene los pigmentos extraídos. Se realizan lecturas de absorbancia a 664, 647 y 480 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700, frente a un blanco de acetona:metanol (2:1).

El valor de los coeficientes y la longitud de onda a la cual se produce la máxima absorción varían en función del solvente utilizado (Parsons y Strickland, 1965). De los propuestos hasta ahora, se han adoptado los de Jeffrey y Humphrey (1975), utilizando las siguientes ecuaciones para el cálculo de la concentración del pigmento

$$\text{Ecuación 3: } [\text{Clorofila } a] = 11'93 A_{664} - 1'93 A_{647}$$

$$\text{Ecuación 4: } [\text{Clorofila } b] = 20'36 A_{647} - 5'5 A_{664}$$

$$\text{Ecuación 5: } [\text{Carotenoides totales}] = 4 A_{480}$$

Dónde la concentración de pigmentos se expresa en $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extracto, y A_{664} , A_{647} y A_{480} representan las absorbancias medidas a 664, 647 y 480 nm.

3.6. Determinación de proteínas hidrosolubles

La cuantificación de la concentración de proteínas hidrosolubles en las células de *S. quadricauda* se determinó mediante el método de Bradford (1975).

Este método se basa en el cambio de color diferencial del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este método cuantifica proteínas y polipéptidos cuyo peso molecular sea superior a 3 kDa. El complejo proteína-colorante tiene un alto coeficiente de extinción, lo cual proporciona sensibilidad al ensayo.

Las células de *S. quadricauda* se recogen por centrifugación en una centrífuga refrigerada ALC PK121R a 8000 g a 4 °C durante 20 minutos. Se retira el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 1 mL de agua destilada. Esta suspensión se somete a 5 ciclos de 30 segundos a 4600 rpm de ruptura celular con microesferas de 212-300 µm de diámetro, con las que se obtiene una ruptura aproximada del 80% de las células. A continuación, se centrifuga de nuevo la muestra para eliminar las microesferas y los restos celulares. El extracto celular así obtenido se diluye con agua destilada en una relación extrato:agua 1:1 (v:v). La reacción colorimétrica se inicia añadiendo colorante azul de Coomassie en una relación muestra:reactivo 2:1 a cada una de las muestras, y agitando suavemente. Las medidas de absorbancia se realizan en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 a 595 nm.

Los cálculos de concentración de proteína se realizan utilizando una recta de calibrado elaborada con seroalbúmina bovina (BSA) como proteína estándar, a diferentes concentraciones comprendidas entre 5 y 25 µg mL⁻¹.

3.7. Análisis de la actividad celular

El diacetato de fluoresceína (DAF), es un éster no polar, no fluorescente y lipofílico que penetra libremente en las células vivas, atravesando las membranas celulares. Tras entrar en las células, esterasas no específicas citoplasmáticas hidrolizan los enlaces éster de la molécula de DAF perdiendo así los residuos acetato. La fluoresceína libre resultante es una molécula polar, hidrofílica, que emite fluorescencia en el espectro del verde cuando se excita con luz azul (480 nm) y que es retenida por las células cuando la membrana plasmática está intacta. En este caso, la ausencia de fluorescencia verde de la fluoresceína, en células viables con la membrana celular intacta, indicaría efectos tóxicos sobre la actividad de las esterasas, que son enzimas esenciales para el funcionamiento normal de la célula (Jochem, 2000). De este modo, analizando si existen diferencias en la tasa de producción de fluoresceína podremos detectar posibles alteraciones de la actividad celular.

La producción de fluoresceína se ha realizado mediante un ensayo espectrofotométrico. Se toman alícuotas de los cultivos microalgales y se les añade DAF, a partir de una solución stock de fluoresceína ($2'5 \text{ mg mL}^{-1}$), para alcanzar una concentración final de $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Tras una incubación adecuada, durante un periodo de tiempo suficiente, la fluoresceína se extrae de las células añadiendo acetona a los tubos de ensayo en una proporción 1:1, siguiendo el protocolo de Schnürer & Rosswall (1982) adaptado a microalgas.

Finalmente, se mide la absorbancia de la fluoresceína producida a 490 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700. La concentración de fluoresceína se calcula a partir de una recta de calibrado realizada con concentraciones de fluoresceína comprendidas entre $0'5$ y $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ a partir de una solución stock de fluoresceína de $2'5 \text{ mg mL}^{-1}$.

3.8. Diseño experimental

Para evaluar los posibles efectos tóxicos del herbicida glifosato sobre la microalga *S. quadricauda* se realizaron experiencias de hasta 144 horas de duración en las que las células se expusieron a distintas concentraciones del herbicida. También se realizaron controles sin herbicida.

Los cultivos se establecieron a partir de un inóculo en fase de crecimiento exponencial en tubos *Kimax* con 40 mL de cultivo. Los cultivos se mantuvieron sin aireación en las mismas condiciones de luz descritas anteriormente para los cultivos stock. La temperatura empleada en la primera experiencia fue de $18 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$ y en la segunda experiencia fue de $22 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$. Se realizaron tres réplicas de cada una de las concentraciones de glifosato ensayadas.

En la primera experiencia, se toman muestras cada 24 horas para la determinación de la densidad celular, mientras que las determinaciones de contenido pigmentario, contenido en proteínas y actividad celular se realizaron a las 144 horas, al final de la experiencia.

En la segunda experiencia sólo se tomaron muestras cada 24 horas para la determinación de la densidad celular.

3.9. Análisis estadístico

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

El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante el programa R versión 3.0.2. En cada experiencia, la hipótesis de que la concentración de antibiótico del medio no afecta al parámetro de estudio se analiza mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) a un nivel de confianza del 95%. Cuando la hipótesis se rechaza, se utiliza el test de rango múltiple de Tukey para analizar de qué forma afecta cada concentración de glifosato al parámetro estudiado. El test de Tukey se aplica a todos los casos al nivel de significación 0'1 ($p < 0'1$).

Las gráficas se realizaron con el paquete de análisis estadístico y de gráficas avanzadas SigmaPlot versión 12.5.

4. Resultados y discusión

4.1. Determinación de la densidad inicial

Los microorganismos utilizados en estudios de ecotoxicidad deben disponer de los recursos suficientes y una densidad celular óptima, para que a lo largo del estudio se produzca una curva de crecimiento logística. De esta forma, todas las observaciones que se realicen a lo largo del tiempo afectarán a todas las células por igual, ya que estas se encontrarán en la misma fase de crecimiento (Prescott *et al.*, 2008; Zwietering *et al.*, 1990).

Antes de estudiar el efecto del glifosato sobre *Scenedesmus quadricauda* se determinó la densidad inicial óptima en la cual el cultivo formaría una curva de crecimiento exponencial (Fig. 2).

La densidad inicial de 1×10^5 células mL^{-1} es la que presentó un mejor crecimiento exponencial, apreciándose una fase lag o de latencia de las 0-24 horas, y después el número de células aumentó exponencialmente hasta alcanzar una densidad final a las 96 horas de $9'33 \times 10^5$ células mL^{-1} .

Por tanto, se utilizó una densidad inicial de 1×10^5 células mL^{-1} para realizar el estudio de los posibles efectos tóxicos del herbicida glifosato sobre la microalga dulceacuícola *S. quadricauda*.

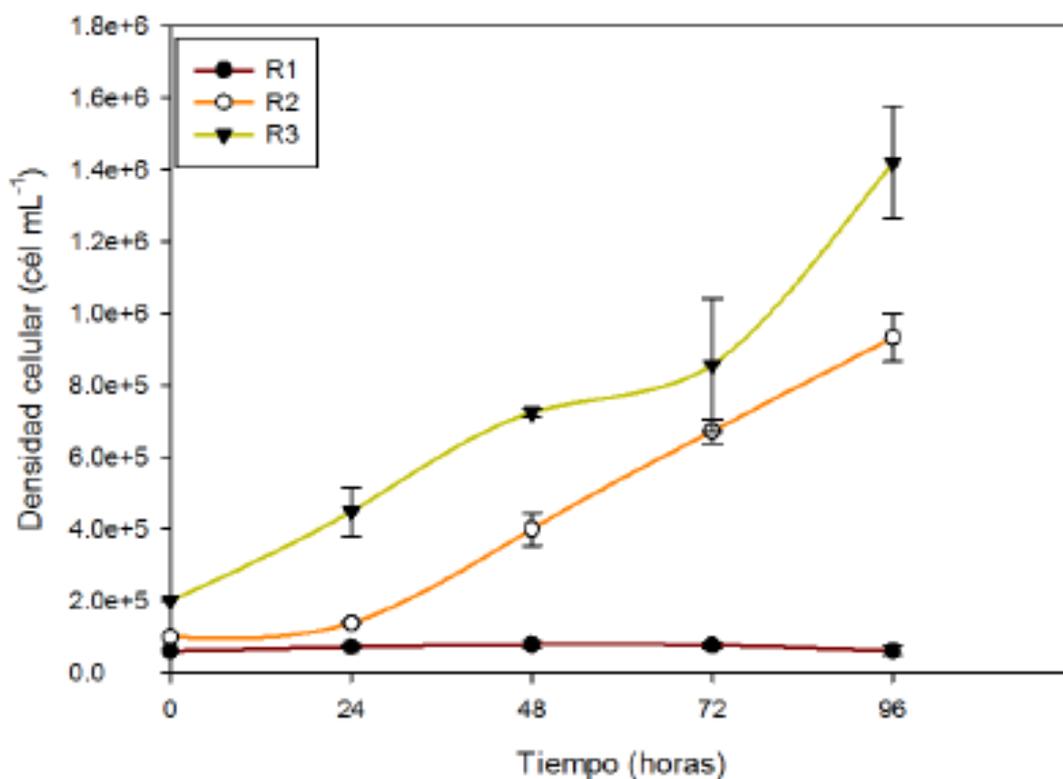


Figura 2. Curvas de crecimiento de los cultivos de *S. quadricauda* con diferentes densidades celulares iniciales. Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas \pm la desviación estándar. R1: 5×10^4 cél mL⁻¹; R2: 1×10^5 cél mL⁻¹; R3: 2×10^5 cél mL⁻¹.

4.2. Crecimiento

Los resultados obtenidos muestran que el crecimiento de *S. quadricauda* se ve ligeramente afectado por la presencia de las concentraciones ensayadas de glifosato en el medio de cultivo a una temperatura de 18 ± 1 °C (Fig. 3).

Los resultados muestran que las concentraciones de glifosato ensayadas ejercen un efecto ligeramente algistático sobre el crecimiento de *S. quadricauda*, no habiendo diferencias significativas entre el control los tratamientos ($p < 0'1$).

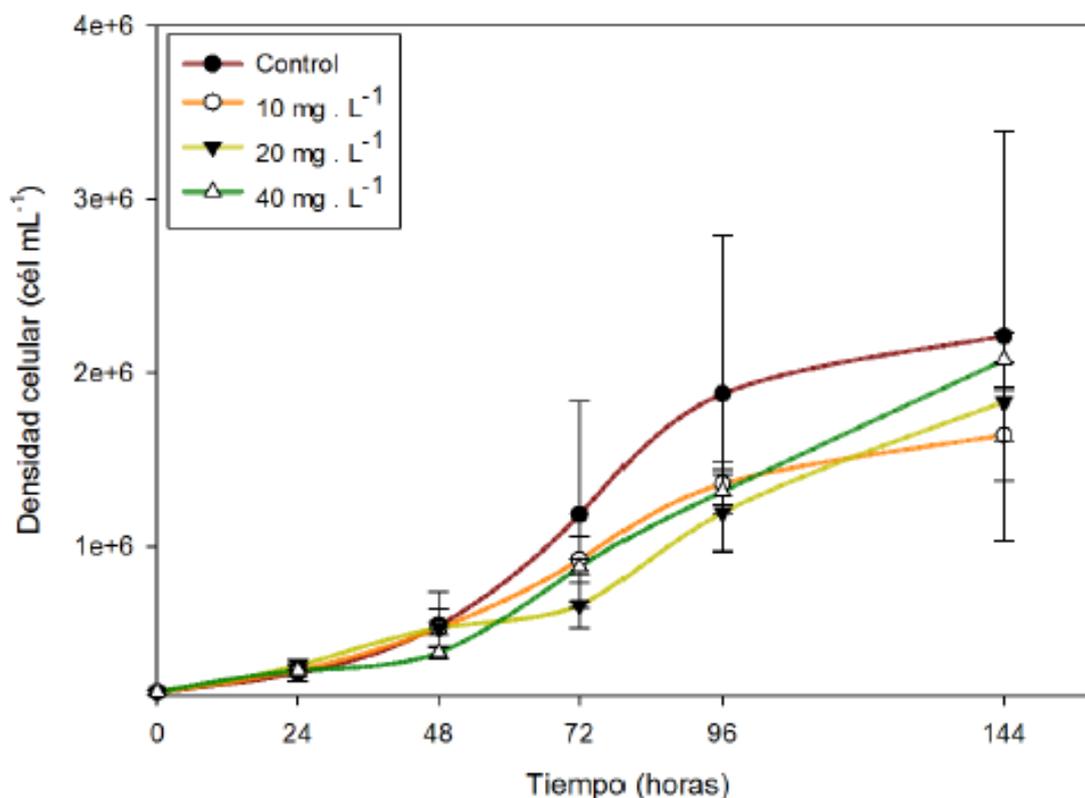


Figura 3. Curva de crecimiento de los cultivos de *S. quadricauda* en ausencia de glifosato (Control) y con diferentes concentraciones de glifosato. Los valores representados corresponden con la media de tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar.

Los valores de la tasa de crecimiento a una temperatura de 18 ± 1 °C se representan en la Tabla 1.

Tabla 1. Tasas de crecimiento los cultivos con diferentes concentraciones de glifosato (expresadas en mg L⁻¹) a las 24, 96 y 144 horas. Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas de cada tratamiento \pm y la desviación estándar.

Cultivo	Tasa crecimiento (dia ⁻¹)		
	24 horas	96 horas	144 horas
Control	0'85 \pm 0'1	0'88 \pm 0'01	0'63 \pm 0'01
10	0'80 \pm 0'25	0'76 \pm 0'04	0'55 \pm 0'05
20	0'94 \pm 0'05	0'71 \pm 0'06	0'58 \pm 0'01
40	0'80 \pm 0'06	0'75 \pm 0'04	0'61 \pm 0'03

Las tasas crecimiento son muy similares en las distintas fases de la curva de crecimiento de *S. quadricauda*, sin que haya diferencias significativas ($p < 0'1$).

La EC50 para el crecimiento (concentración efectiva) después de una exposición de 96 horas a glifosato fue de 1'79 mg L⁻¹, muy inferior a 7'2 mg L⁻¹ observados por otros autores (Sáenz et al., 2009).

Se observó que las células tratadas con glifosato a la mayor concentración ensayada (40 mg L⁻¹) formaron estructuras cilíndricas aisladas, a diferencia de las células del control que mostraban cenobios de 4 células (Fig. 4).

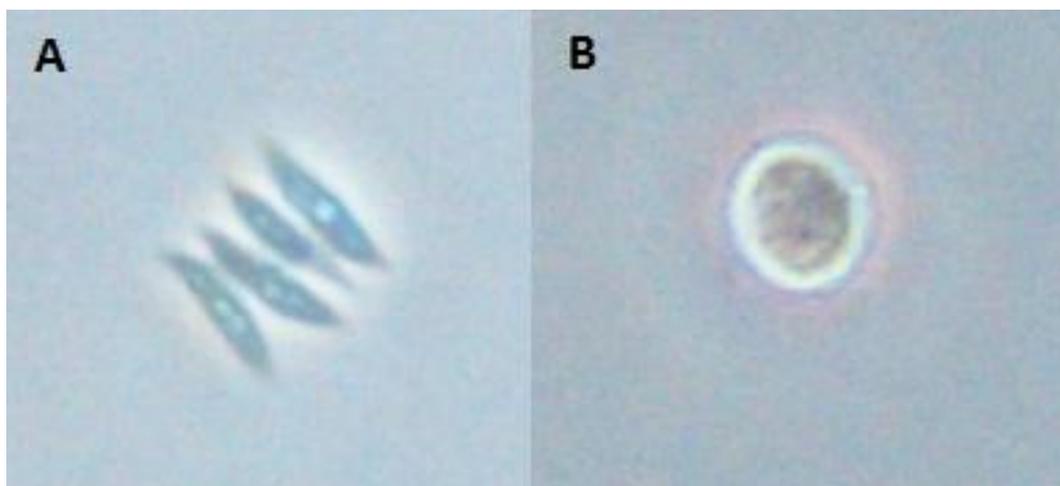


Figura 4. Imágenes tomadas mediante microscopio de fluorescencia de las células control y tratadas con glifosato a una concentración de 40 mg L⁻¹. Se observa que las células forman cenobios de 4 células (A) y células aisladas cilíndricas (B).

A la vista de los resultados, el glifosato no solo afecta a las tasas de crecimiento sino que también tienen un efecto considerable en la estructura de las células de *S. quadricauda*.

En los últimos años se han venido desarrollando bioensayos basados en nuevos parámetros y métodos cada vez más rápidos, sencillos, prácticos y sensibles para la detección de contaminantes y el estudio de su toxicidad, pero el crecimiento sigue siendo el parámetro más utilizado hasta la fecha para estudiar los efectos de compuestos tóxicos sobre las microalgas en los ensayos de toxicidad crónicos (van Wezel & van Vlaardingen, 2004). La determinación de la densidad celular o número de células como medida del crecimiento microalgal es un parámetro fundamental en los ensayos de toxicidad de cualquier agente. En numerosos ensayos, la toxicidad se mide en función de la reducción de la tasa de crecimiento o de la biomasa final, en relación a un control (Hogan *et al.*, 2005; Debelius *et al.*, 2008; Nie *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009; Strom *et al.*, 2009). Hay estudios en los que se concluye que este parámetro es menos sensible que otros como la morfología celular o la producción fotosintética (Geoffroy *et al.*, 2007), pero existen otros trabajos cuyos resultados indican que el crecimiento es el parámetro más sensible dentro de los estudiados (Franklin *et al.*, 2001a; Franklin *et al.*, 2001b; Strom *et al.*, 2009), aunque esto depende del organismo, del contaminante y de los parámetros estudiados.

El efecto de un contaminante sobre el crecimiento refleja un valor medio de la población estudiada sin tener en cuenta la respuesta que se produce a nivel celular (Geoffroy *et al.*, 2007). Puesto que los cambios ambientales afectan directamente a las células, antes de que se manifieste el efecto sobre la población, resulta conveniente la medida de otros parámetros celulares, como la medida de pigmentos y proteínas, y la actividad celular.

4.3. Pigmentos

Los resultados de este estudio mostraron que una concentración de glifosato de 40 mg L⁻¹ redujo significativamente ($p < 0.1$), el contenido en clorofila *a* en *Scenedesmus quadricauda* con respecto a lo observado en las células de los cultivos del control, después de 144 horas de exposición. Sin embargo, concentraciones de 10 y 20 mg L⁻¹ de glifosato, no produjeron variaciones significativas ($p < 0.1$) con respecto al control. El contenido celular de los pigmentos de clorofila *b* y carotenoides también mostraron una ligera disminución en los cultivos tratados de *S. quadricauda*, aunque esta diferencia no fue significativa ($p < 0.1$) con respecto los controles (Fig. 5).

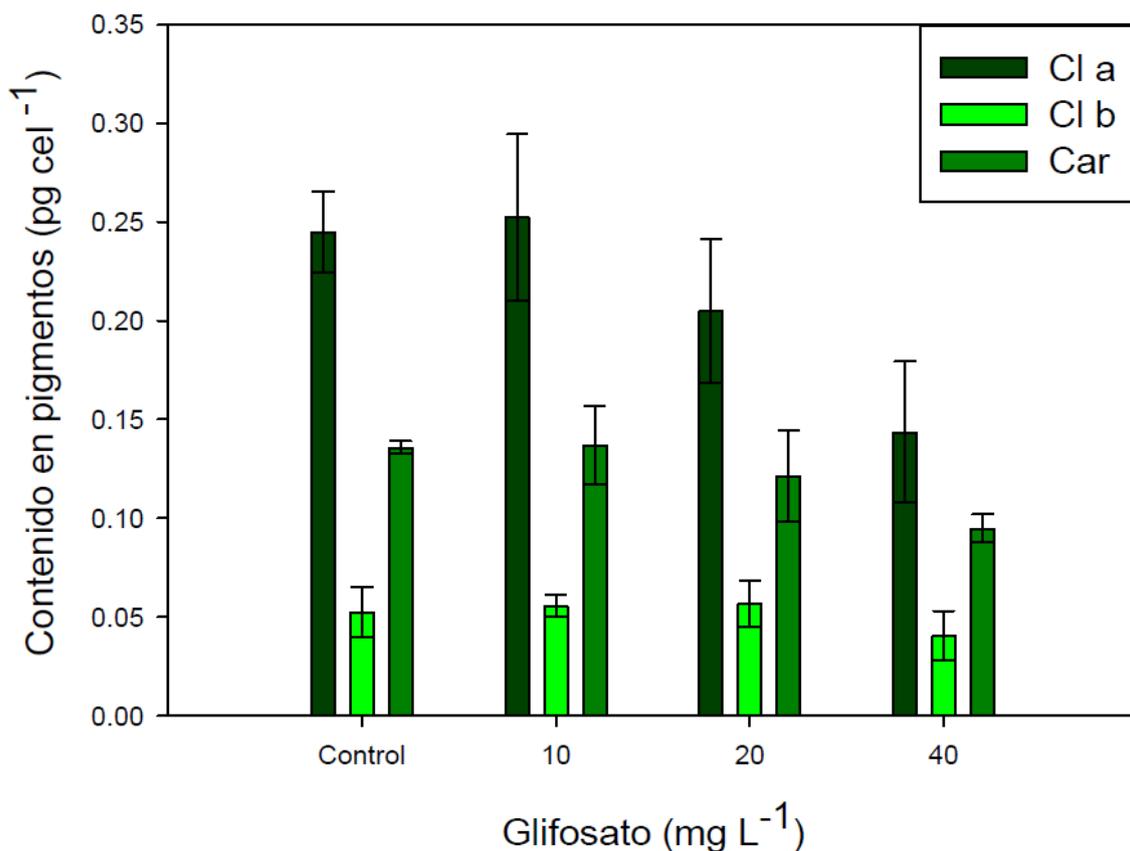


Figura 5. Contenido celular de pigmentos en cada uno de los tratamientos con diferentes concentraciones de glifosato a las 144 horas de exposición. Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar. Cl a: clorofila *a*; Cl b: clorofila *b*; Car: carotenoides.

Las concentraciones celulares de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides disminuyen por la exposición de la microalga a las distintas concentraciones de glifosato; después de 144 horas de exposición, el contenido de clorofila *a* en las células del control presenta unos valores de $0'24 \pm 0'02 \text{ pg cel}^{-1}$ mientras que en el resto de células tratadas a distintas concentraciones de glifosato varía entre $0'25 \pm 0'04$ y $0'14 \pm 0'03 \text{ pg cel}^{-1}$; el contenido en clorofila *b* del control presentó un valor de $0'052 \pm 0'01 \text{ pg cel}^{-1}$ mientras que en el resto de concentraciones de glifosato varía entre $0'05 \pm 0'005$ y $0'04 \pm 0'01 \text{ mg cel}^{-1}$; el contenido en carotenoides del control presenta un valor de $0'13 \pm 0'003 \text{ mg cel}^{-1}$ mientras que en el resto de concentraciones de glifosato varía entre $0'13 \pm 0'02$ y $0'09 \pm 0'007 \text{ mg cel}^{-1}$. Esta reducción en el contenido celular de los pigmentos, en especial en clorofila *a*, podría deberse a que el glifosato afecte al aparato fotosintético de las células de *S. quadricauda*.

Las variaciones de pigmentos en las microalgas nos permiten conocer su estado fisiológico y los cambios que se dan en este como respuesta al estrés ambiental (Hendry & Price, 1993; Masojídek *et al.*, 2000). Por ello, el contenido en pigmentos es utilizado como biomarcador de exposición de diversos tóxicos en microalgas (Couderchet & Vernet, 2003).

Los herbicidas suelen actuar sobre el aparato fotosintético y afectar a la síntesis de clorofilas (Ruizzo *et al.*, 1992) induciendo clorosis en las células afectadas (Prado *et al.*, 2011). Concretamente, el glifosato actúa principalmente sobre la enzima enolpiruvilsiquiato-3-fosfatasa (EPSPS) que se encuentra normalmente dentro de los cloroplastos, bloqueándola, lo que tiene repercusiones en el aparato fotosintético y los pigmentos (Salazar *et al.*, 2011).

Las posibles variaciones en los ratios de los pigmentos nos permiten determinar distintas características de las células y de su estado fisiológico, como son el envejecimiento o la adaptación al estrés oxidativo (Kobayashi *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 1997; Masojídek *et al.*, 2000).

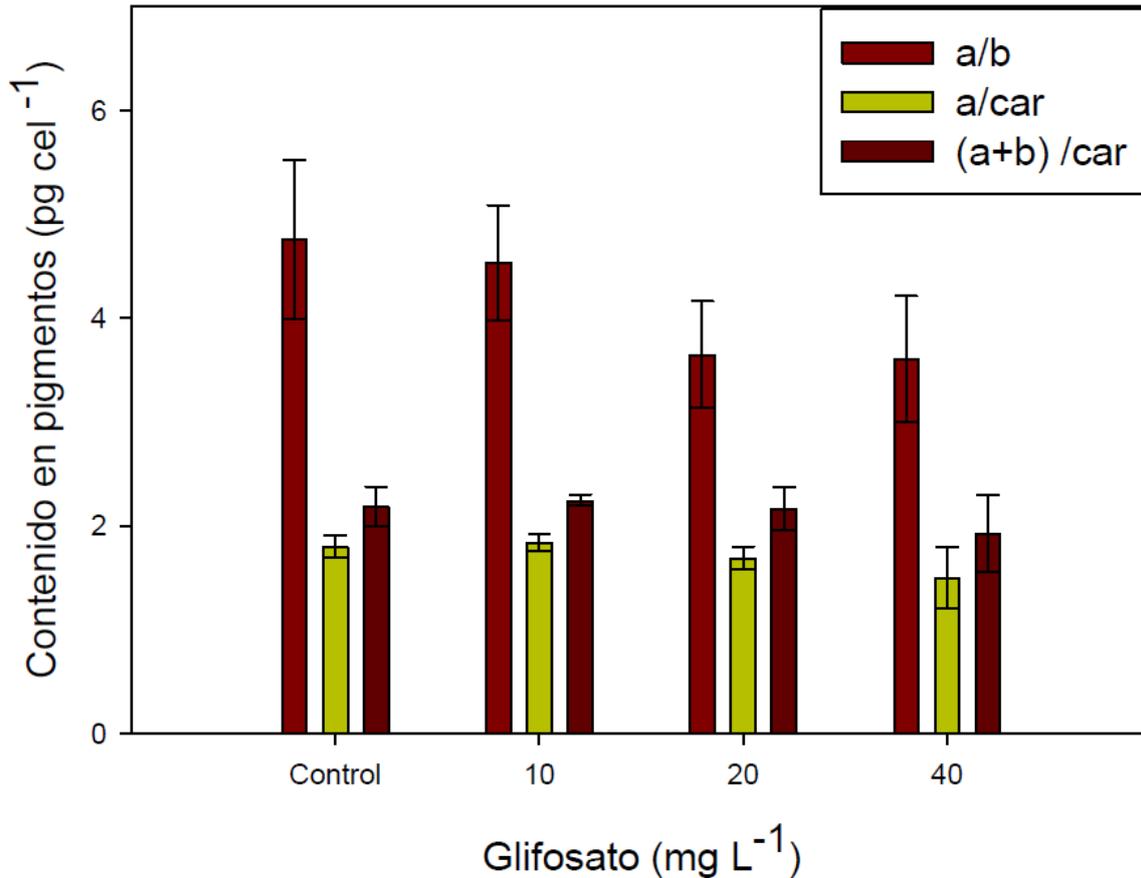


Figura 6. Ratios de los pigmentos contenidos en las células de los tratamientos a diferentes concentraciones de glifosato a las 144 horas de exposición. Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar. a/b: ratio clorofila a/clorofila b; a/car: ratio clorofila a/carotenoides; (a+b)/car: ratio (clorofila a + clorofila b) /carotenoides.

Se observó una ligera disminución de los ratios de los pigmentos en las células *S. quadricauda* tratadas con diferentes concentraciones de glifosato respecto de las células del control, aunque esta no fue significativa para ningún tratamiento (Fig. 6). Observando todos estos datos, se determinó que el contenido de clorofilas a de las células de *S. quadricauda* expuestas a glifosato disminuyó, mientras que el resto de pigmentos no se vieron significativamente afectados ($p < 0'1$). Los resultados obtenidos no parecen indicar que las células estuvieran afectadas por estrés oxidativo.

4.4. Proteínas

El contenido celular en proteínas es un parámetro que se emplea para estudiar el efecto tóxico de los contaminantes sobre los organismos acuáticos (Livingstone, 2001; Valavanidis *et al.*, 2006).

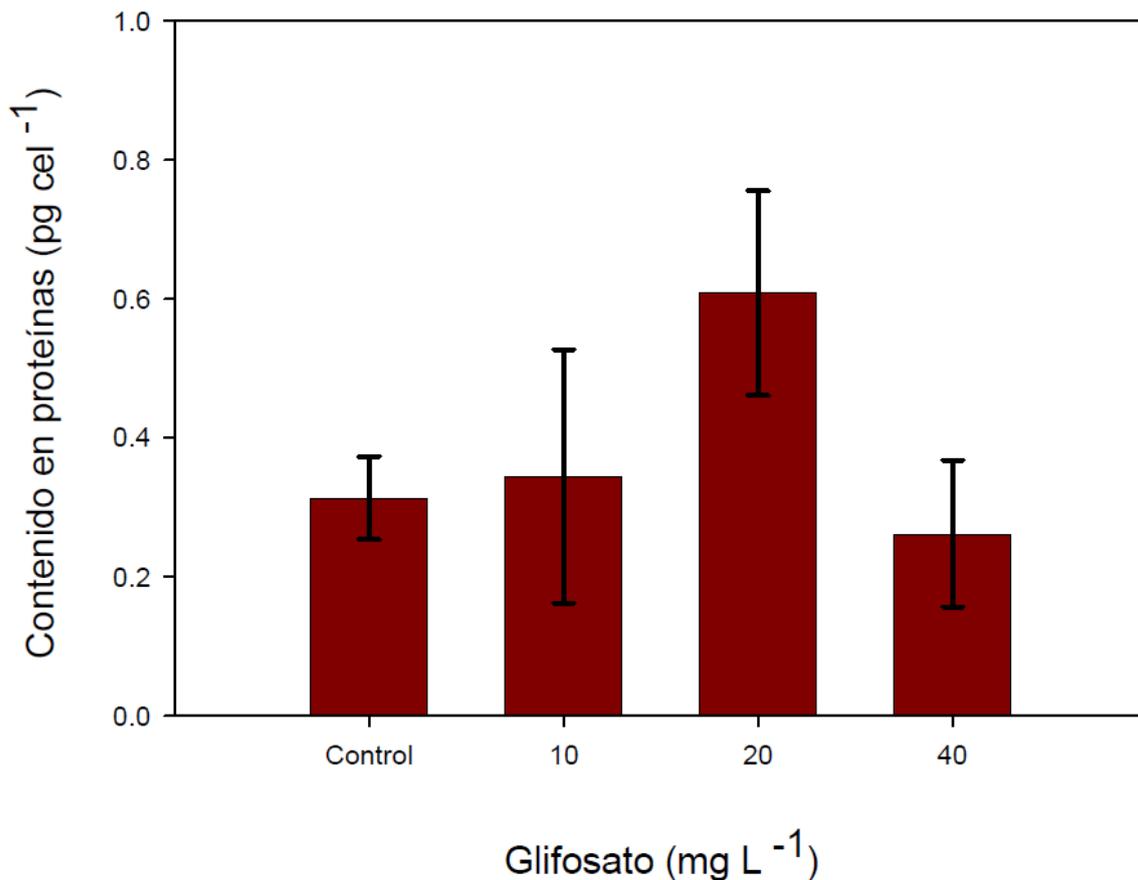


Figura 7. Contenido celular de proteínas en cada uno de los tratamientos con diferentes concentraciones de glifosato a las 144 horas de exposición. Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar.

Se observó un aumento significativo ($p < 0'1$) del contenido celular en proteínas en los cultivos expuestos a 20 mg L⁻¹ de glifosato con respecto a los cultivos control, mientras que las células expuestas a la mayor concentración ensayada (40 mg L⁻¹) presentaron un contenido menor de proteínas, no significativamente diferente al de los cultivos control ($p < 0'1$) (Fig. 7).

Se esperaban alteraciones en el contenido celular de proteínas ya que se ha descrito que el glifosato suprime la capacidad de generar aminoácidos aromáticos lo que afecta a la síntesis de determinadas proteínas (Salazar *et al.*, 2011). El posible aumento de la síntesis de proteínas a una concentración de 20 mg L⁻¹ de glifosato posiblemente se deba a que el glifosato tienen un efecto de hormesis sobre las células de *S. quadricauda* (Spoljaric *et al.*, 2011). Concentraciones de glifosato superiores a las ensayadas podrían provocar esa reducción esperada del contenido proteico celular.

4.5. Actividad celular

La medida de inhibición de la actividad enzimática en microalgas es un indicador rápido y sensible de estrés ambiental (Blaise & Ménard, 1998). La actividad esterasa se

relaciona con la actividad metabólica celular general (Regel *et al.*, 2002; Regel *et al.*, 2004) en una gran variedad de células (Adam & Duncan, 2001; Breeuwer *et al.*, 1995).

La actividad celular en los cultivos control fue de $1'77 \pm 0'70$ pg fluoresceína $\text{cél}^{-1} \text{h}^{-1}$, mientras que en todos los cultivos expuestos a glifosato no se detectó actividad, ya que no se detectó fluoresceína en el análisis espectrofotométrico, lo que indica diferencias significativas entre el control y los tratamientos.

Dado que los cultivos expuestos a glifosato presentaban crecimiento como se ha indicado anteriormente, ambos resultados no resultaban compatibles. Por ello, se comprobó mediante microscopía de epifluorescencia si se producía o no fluoresceína libre en los cultivos expuestos a glifosato. Se comprobó que las células tratadas con glifosato a la mayor concentración ensayada (40 mg L^{-1}) seguían activas (Fig. 8).

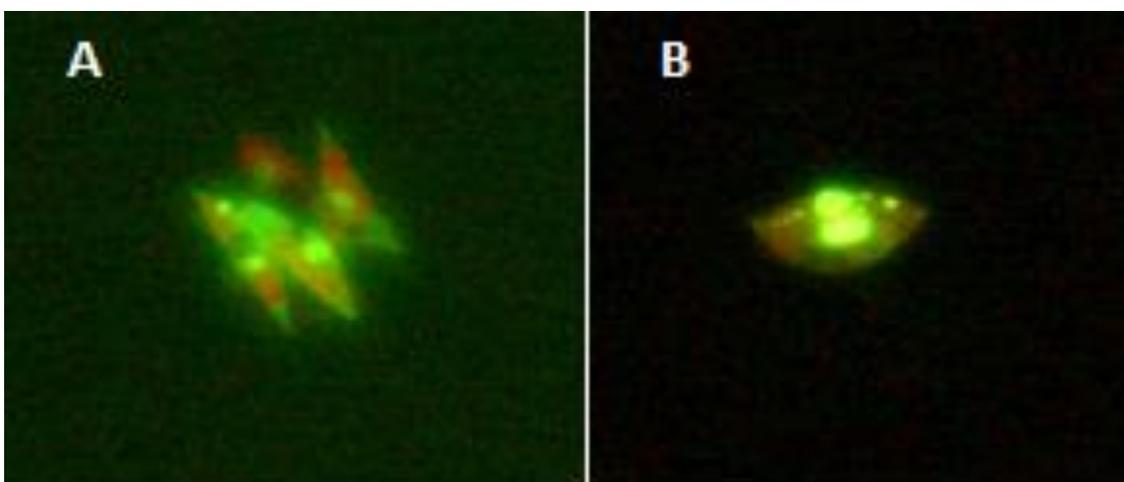


Figura 8. Imágenes tomadas mediante microscopio de fluorescencia de las células tratadas con glifosato a una concentración de 40 mg L^{-1} . Se observa que las células están activas antes de extraer la fluoresceína con acetona (A) y después de la extracción con acetona (B).

Es decir, las células afectadas por el glifosato se mantienen activas pero no se puede extraer la fluoresceína de su interior con el protocolo utilizado. Esto posiblemente se deba a que la pared celular de *Scenedesmus quadricauda* se ha modificado como respuesta al estrés ejercido por el glifosato, impidiendo la extracción de la fluoresceína para poder ser medida con el espectrofotómetro.

4.6. Influencia del aumento de la temperatura sobre la toxicidad del herbicida glifosato

La temperatura es uno de los parámetros que más influye sobre los organismos. Los cambios de temperatura pueden suponer grandes variaciones en los efectos que ejerce un tóxico sobre un organismo (Manciocco *et al.*, 2014).

Para comprobar el potencial efecto de la temperatura sobre la toxicidad ejercida por el herbicida glifosato en cultivos de *Scenedesmus quadricauda* se llevaron a cabo cultivos en las mismas condiciones ambientales de nutrientes y luz que los realizados anteriormente pero a una temperatura superior, 22 ± 1 °C.

Los resultados obtenidos mostraron tasas de crecimiento inferiores a las tasas de crecimiento del apartado 4.2, con una temperatura de 18 ± 1 °C. Se observó que a esta temperatura más elevada, el glifosato resulto más toxico especialmente a la mayor concentración ensayada (40 mg L^{-1}). Esto podría deberse a que las células de *S. quadricauda* están sometidas a un mayor estrés al aumentar su temperatura en presencia del glifosato.

Tabla 2. Tasas de crecimiento del cultivo control y de los cultivos con diferentes concentraciones de glifosato (mg L^{-1}) a las 24, 96 y 144 horas. Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas de cada tratamiento \pm y la desviación estándar.

Cultivo	Tasa crecimiento (dia^{-1})		
	24 horas	96 horas	144 horas
Control	$0'73 \pm 0'13$	$0'71 \pm 0'06$	$0'44 \pm 0'15$
10	$0'64 \pm 0'21$	$0'61 \pm 0,01$	$0'49 \pm 0'08$
20	$0'72 \pm 0'05$	$0'62 \pm 0,09$	$0'52 \pm 0'06$
40	$0'2 \pm 0'17$	$0'56 \pm 0,04$	$0'45 \pm 0'04$

La EC50 (concentración efectiva) para las células tratadas con glifosato a una temperatura de 22 ± 1 °C después de una exposición de 96 horas es de $0'55 \text{ mg L}^{-1}$, valor más de 3 veces menor que la EC50 observada a 18 ± 1 °C ($1'79 \text{ mg L}^{-1}$).

En un escenario de cambio global, un aumento de la temperatura implicaría que, las células de *S. quadricauda* fuesen más sensibles a los efectos tóxicos del glifosato.

5. Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que las concentraciones de glifosato ensayadas no inhiben significativamente el crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* pero si provoca alteraciones estructurales (forma y pared celular). El contenido de clorofila α se vio reducido considerablemente en proporción a la cantidad de glifosato en el medio, mientras que el contenido en proteínas aumentó a concentraciones intermedias (20 mg L^{-1}) de glifosato en el medio, posiblemente debido a un efecto de hormesis. El protocolo utilizado para la determinación de la actividad celular no fue adecuado ya que las células de *S. quadricauda* expuestas a glifosato siguen activas aunque la medida de la actividad celular fuese nula; esta contradicción podría explicarse por modificaciones en la pared de las células debidas al estrés

producido por el glifosato y que impidieron la extracción de la fluoresceína para su determinación. Finalmente, ante un aumento de la temperatura las células de *S. quadricauda* serán más sensibles al efecto tóxico del glifosato.

6. Bibliografía

- Adam G. & Duncan H. (2001). Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol. Biochem.* 33: 943-951.
- Albarracín I., Pío G., Salomón R. & Cravero M. (2011). Inhibición del crecimiento de *Chlamydomonas* sp. por la sal isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina. *Rev. Cuban. Investig. Pesq.* 28(1): 30-35.
- Blaise C. & Ménard L. (1998). A micro-algal solid phase test to assess the toxic potential of freshwater sediments. *Water Qual Res. J. Can.* 33: 133-151.
- 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.
- Breeuwer P., Drocourt J. L., Bunschoten N., Zwietering M. H., Rombouts F. M. & Abee T. (1995). Characterisation of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1614-1619.
- Brown T. E., Richardson F. L. & Vaughn M. L. (1967). Development of red pigmentation in *Chlorococcum wimmeri* (Chlorophyta: *Chlorococcales*). *Phycologia* 6: 167-184.
- Boyle T.P. (1984). *The effect of environmental contaminants on aquatic alga*. In: Shubert L.E. (ed.). *Algae as ecological indicator*. Academic Press, New York p 237-256.
- Cambra J., Álvarez-Cobelas M., & Abgal M. (1998). *Lista florística y bibliográfica de los clorófitos (Chlorophyta) de la Península Ibérica, Islas baleares e Islas Canarias*. Asociación Española de Limnología, Madrid.
- Couderchet M. & Vernet G. (2003). Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 55: 271-277.
- Debelius B., Forja J. M., Del Vals A. & Lubián L. M. (2008). Effect of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and atrazine on marine microalgae. *Mar. Pollut. Bull.* 57: 559-568.
- Fargasova, A. (1994a). Comparative study of plant growth hormone (herbicide) toxicity in various biological subjects. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 29: 359-364.
- Fargasova, A. (1994b). Toxicity determination of plant growth hormones on aquatic alga - *Scenedesmus quadricauda*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52: 706-711.
- Fenoll J., Vela N., Navarro G., Pérez-Lucas G. & Navarro S. (2014). Assessment of agro-industrial and composted organic wastes for reducing the potential leaching of triazine herbicide residues through the soil. *Sci. Total Environ.* 493: 124-132.
- Franklin N. M., Adams M. S., Stauber J. L. & Lim R. P. (2001a). Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40: 469-480.

- Franklin N. M., Stauber J. L. & Lim R. P. (2001 b). Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 160-170.
- Geoffroy L., Gilbin R., Simon O., Floriani M., Adam C., Pradines C., Cournac L. & Garnier-Laplace J. (2007). Effect of selenite on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 83: 149-158.
- Giesy J. P., Dobson S., & Solomon K. R. (2000). Ecotoxicological risk assessment of Roundup herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 167: 35-120.
- Haglund K. (1997). *The use of algae in aquatic toxicity assessment*. In: Round F. E. y Chapman D. J. (Ed.). *Progress in Phycological Research*. Biopress Lts., Bristol, England. Pp. 181-212.
- Hendry G. A. F. & Price A. H. (1993). *Stress indicators: chlorophylls and carotenoids*. In: Hendry G. A. F. & Grime J. P. (Ed.). *Methods in comparative plant ecology*. Chapman & Hall, London. Pp. 148-152.
- Hogan A. C., Stauber J. L., Pablo F., Adams M. S. & Lim R. P. (2005). The development of marine toxicity identification evaluation (TIE) procedures using the unicellular alga *Nitzschia closterium*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48: 433-443.
- Industry Task Force on Glyphosate. El glifosato: aspectos de seguridad y uso de los herbicidas que contienen glifosato en Europa. Disponible en: <http://www.glifosato.es/noticias>. Fecha de actualización: 11/7/2013. Fecha de consulta: 10/5/2014.
- Jeffrey S.W. & Humphrey G.F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 167: 191-194.
- Jochem F.J. (2000). Probing the physiological state of phytoplankton at the single cell level. *Sci. Mar.* 64: 183-195.
- Källqvist T. & Svenson A. (2003). Assessment of ammonia toxicity in tests with the microalga, *Nephroselmis pyriformis*, *Chlorophyta*. *Water Res.* 37: 477-484.
- Kobayashi M., Kakizono T. & Nagai S. (1993). Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate induced cyst cell of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 867-873.
- Kobayashi M., Kurimura Y., Kakizono T., Nishio N. & Tsuji Y. (1997). Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* 84: 94-97.
- Livingstone D. R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42: 656-666.
- Ma J., Lin F., Wang S. & Xu L. (2003). Acute toxicity assessment of 21 herbicides to the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71: 594-601.
- Ma J., Lin F., Wang S. & Xu L. (2004). Acute toxicity assessment of 20 herbicides to the green alga *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72: 1164-1171.
- Mallmann L. S., Sampaio S. C., Machado S. R., Sorace M. & Andrade L. H. (2013). Effects of swine wastewater on glyphosate leaching by liquid chromatography. *Journal of Food, Agriculture & Environment Vol II* (2): 908-914.

- Manciocco A., Calamandrei G., & Alleva E. (2014). Global warming and environmental contaminants in aquatic organisms: The need of the ethotoxicology approach. *Chemosphere* 100: 1-7.
- Masojádek J., Torzillo G., Kopecký J., Koblížek M., Nidiaci L., Komenda J. Lukavská A. & Sacchi A. (2000). Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococcum* sp. Grown under nitrogen deficiency and salinity stress. *J. Appl. Phycol.* 12: 417-426.
- Nie X., Gu J., Lu J., Pan W. & Yang Y. (2009). Effects of norfloxacin and butylated hydroxyanisole on the freshwater microalga *Scenedesmus obliquus*. *Ecotoxicology* 18:67-684.
- Nordic Microalgae and Aquatic Protozoa. *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Bréb. In Bréb. & Godey. Disponible en: <http://nordicmicroalgae.org/taxon/Scenedesmus%20quadricauda>. Fecha de consulta: 25/6/2014.
- Ortega-Mayagoitia E. & Rojo C. (2000). Fitoplancton del Parque Nacional las Tablas de Daimiel. III. Diatomeas y Clorofitas. *Anales Jard. Bot. Madrid.* 58(1): 17-37.
- Parsons T R. & Strickland J.D.H. (1965). Particulate organic matter. III. I. Pigment analysis. III. II. Determination of phytoplankton pigments. *J. Fish. Res. Board Can.* 18: 117-127.
- Pereira J. L., Antunes S. C., Castro B. B., Marques C. R., Gonçalves A. M. M., Gonçalves F. & Pereira R. (2009). Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulations versus active ingredient. *Ecotoxicology* 18: 455-463.
- Prado R., García R., Rioboo C., Herrero C., Albade J. & Cid A. (2009). Comparation 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. & Cid A. (2009). The herbicide paraquat induce alterations in the elemental and biochemical composition of non-target microalgal species. *Chemosphere* 76(10): 14440-14444.
- Prado R., Rioboo C., Herrero C. & Cid A. (2011). Characterization of cell response in *Chlamydomonas moewusii* culture exposed to the herbicide paraquat: Induction of chlorosis. *Aquat. Toxicol.* 102: 10-17.
- Prescott L. M., Harley J. P. & Klein D. A. (2008). Microbiología. (Ed. 7). S. A. McGraw-Hill/Interamericana de España.
- Regel R. H., Brookes J. D., Ganf G. G. & Griffiths R. W. (2004). The influence of experimentally generated turbulence on the Mash01 unicellular *Microcystis aeruginosa* strain. *Hydrobiologia* 517: 107-120.
- Regel R. H., Ferris J. M., Ganf G. G. & Brookes J. D. (2002). Algal esterase activity as a biomeasure of environmental degradation in a freshwater creek. *Aquat. Toxicol.* 59: 209-223.
- Rosenström U. & Lepistö L. (1996). Phytoplankton indicator species of different types of boreal lakes. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.* 116: 131-140.
- Ruizzo M. A., Bertekap R. & Mishkind M. L. (1992). Consequences of herbicide induced pigment deficiencies on thylakoid membrane proteins of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 81: 13-20.

- Sabater C. & Carrasco J. M. (2001). Effects of pyridaphenthion on growth of five freshwater species of phytoplankton. A laboratory study. *Chemosphere* 44: 1775-1781.
- Sáenz M. E. & Di Marzio W. D. (2009). Ecotoxicidad del herbicida glifosato sobre cuatro algas clorófitas dulceacuícolas. *Limnetica* 28(1): 149-158.
- Sáenz M. E., Alberdi J. L., Di Marzio W. D., Accorinti J. & Tortorelli M. C. (1997). Paraquat toxicity to different Green algae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58: 922-928.
- Salazar N. J. & Aldana M. L. (2011). Herbicida glifosato: usos, toxicidad y regulación. *BIOtecnia* XIII (2): 23-28.
- Schnürer J. & Rosswall T. (1982). Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1256-1261.
- Shubert L. E. & Trainor F. R. (1974). *Scenedesmus* morphogenesis. Control of the unicell stage with phosphorus. *Brit. Phycol. J.* 9(1): 1-7.
- Spoljaric D., Cipak A., Horvatic J., Andrisic L., Waeg G., Zarkovic N. & Jaganjac M. (2011). Endogenous 4-hydroxy-2-nonenal in microalga *Chlorella kessleri* acts as a bioactive indicator of pollution with common herbicides and growth regulating factor of hormesis. *Aquat. Toxicol.* 105: 552-558.
- Strom D., Rapp P. J. & Strauber J. L. (2009). Development of a toxicity identification evaluation protocol using chlorophyll-a fluorescence in a marine microalga. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56:30-38.
- Tsui M. T. K. & Chu L. M. (2008). Environmental fate and non-target impact of glyphosate-based herbicide (Roundup) in a subtropical wetland. *Chemosphere* 71: 439-446.
- Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M. & Scoullos M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 64: 178-189.
- Van Wezel A. P. & van Vlaardingen P. (2004). Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquat. Toxicol.* 66: 178-189.
- Walsh G. E., Deans C. H. & McLaughlin M. J. (1987). Comparison of the EC50s of algal toxicity tests calculated by four methods. *Environ. Toxicol. Chem.* 6: 767-770.
- Walther G., Post E., Convey P., Menzel A., Parmesan C., Beebee T. J. C., Fromentin J., Hoegh-Guldberg O. & Bairlein F. (2002). Ecological responses to recent climate change. Review. *Nature* 416: 389-395.
- Wong P. K. (2000). Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Breb 614. *Chemosphere* 41: 177-182.
- Zwietering M. H., Jongenburger I., Rombouts F. M. & Riet K. van T. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (6): 1875–1881