



**Facultad de Ciencias.
Departamento de Biología Celular y Molecular.
Área de Microbiología.**

Efecto do desinfectante cloruro de benzalconio sobre a microalga doceacuícola *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brebisson.

Efecto del desinfectante cloruro de benzalconio sobre la microalga dulceacuícola *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brebisson.

Effect of disinfectant benzalkonium chloride on freshwater microalgae *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brebisson.

Sofía Ortún Capellán

Trabajo de fin de grao

29 de junio de 2015

Dirigido por Dra. M^a Concepción Herrero López.

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

Contenido

Resumen.....	1
Abstract	1
1. Introducción	2
2. Objetivo.....	4
3. Material y métodos	5
3.1. Descripción de la microalga dulceacuicola utilizada	5
3.2. Cultivo microalgal.....	5
3.3. Desinfectante	6
3.4. Crecimiento	7
3.4.1.Densidad óptica.....	7
3.4.2.Recuento del número de células.....	7
3.4.3.Parámetros de crecimiento.....	8
3.5. Determinación espectrofotométrica de pigmentos fotosintéticos	8
3.6. Análisis de la actividad celular.....	9
3.7. Diseño experimental	10
3.8. Análisis estadístico	10
4. Resultados y discusión	11
4.1. Crecimiento	11
4.2. Pigmentos fotosintéticos	15
4.3. Actividad celular	17
5. Conclusiones.....	19
Conclusions.....	19
6. Bibliografía	20
7. Agradecimientos	23

Resumen

El cloruro de benzalconio es utilizado frecuentemente como producto de limpieza y desinfección. Su uso intensivo puede provocar la contaminación de los medios acuáticos. Esto nos ha llevado a investigar su potencial efecto tóxico sobre la microalga dulceacuícola *S. quadricauda*. Para este objetivo, se estudió el crecimiento, la concentración de pigmentos fotosintéticos y la actividad celular para detectar la toxicidad de cinco concentraciones del desinfectante comprendidas entre 0.25-4 mg L⁻¹ en cultivos discontinuos.

Los resultados obtenidos muestran que la tasa de crecimiento de *S. quadricauda* disminuye significativamente en presencia de cloruro de benzalconio, y se obtiene un valor de EC₅₀ de 3.75 mg L⁻¹ después de 192 horas de exposición. El contenido celular de pigmentos también está afectado negativamente, decreciendo significativamente en cultivos expuestos a concentraciones superiores a 1 mg L⁻¹; esto puede ser debido al mecanismo de acción del desinfectante sobre las membranas tilacoidales. La actividad celular también se ha visto afectada por la presencia del desinfectante.

PALABRAS CLAVE:

Scenedesmus quadricauda, cloruro de benzalconio, desinfectante, microalga dulceacuícola.

Abstract

Benzalkonium chloride is often used as a cleaning and disinfecting product. The intensive use of this disinfectant may cause pollution of aquatic environments. Therefore, the potential toxic effect of benzalkonium chloride on the freshwater microalgae *S. quadricauda* was investigated. Growth, photosynthetic pigments content and cellular activity were assayed with five disinfectant concentrations between 0.25-4 mg L⁻¹ on batch cultures. Control cultures without disinfectant were also included.

Growth rate of *S. quadricauda* significantly decreased in presence of benzalkonium chloride, and the EC₅₀ was 3.75 mg L⁻¹ after 192 hours of exposure. Photosynthetic pigments content was also adversely affected, decreasing significantly in cultures exposed to concentrations above 1 mg L⁻¹. This decrease may be due to the mechanism of action of the disinfectant on thylakoid membranes. Cellular activity was also affected by the presence of the disinfectant.

KEYWORDS:

Scenedesmus quadricauda, benzalkonium chloride, disinfectant, freshwater microalgae.

1. Introducción

El agua dulce es un recurso natural escaso, indispensable para la vida y el mantenimiento del medio ambiente. Durante décadas, toneladas de sustancias químicas derivadas de la actividad humana han sido vertidas al medio ambiente sin reparar en posibles consecuencias. Progresivamente, se fueron adoptando medidas legislativas para controlar la contaminación química de las aguas y los riesgos que conlleva el vertido de sustancias sintetizadas para su uso en agricultura, industria, medicina...

Sin embargo, en los últimos años, debido al desarrollo de nuevos métodos de análisis se detectó la presencia de otros contaminantes, potencialmente peligrosos, denominados globalmente como emergentes.

Los contaminantes emergentes son compuestos de distinto origen y naturaleza química, de los cuales se sabe relativamente poco sobre su impacto en el medio ambiente. La característica importante de este grupo es que no necesitan persistir en el medio ambiente para causar efectos negativos, ya que sus altas tasas de transformación se pueden compensar con su continua introducción en este (Petrovic *et al.* 2003). Dentro de estos productos podemos encontrar surfactantes, productos farmacéuticos, productos para el cuidado persona, etc, para la mayoría de los cuales es difícil predecir los efectos tóxicos que pueden tener sobre los seres humanos y los organismos acuáticos.

Un contaminante emergente es el cloruro de benzalconio, un compuesto de amonio cuaternario que posee propiedades surfactantes, es bipolar e hidrosoluble. Es un agente antimicrobiano utilizado para la desinfección y conservación de productos farmacéuticos y cosméticos (Pérez *et al.* 2009) desde 1935, cuando Gerhard Domagk lo sintetizó y caracterizó (Thorsteinsson *et al.* 2003). Además, es un ingrediente activo de uso común en productos de limpieza y desinfección en los hospitales (Donowitz 1991; Kümmerer *et al.* 1997). Otros usos registrados de este desinfectante son: suavizantes para tejidos, emulsionantes, conservantes y antisépticos en medicamentos y también como fungicidas, espermicidas, viricidas, y en la última década, se ha introducido en la formulación de alguicidas para piscinas. También, es utilizado en el medio marino para el tratamiento contra hongos u otras infecciones en especies de acuicultura (Hoskins y Dalziel 1984; Lio-Po y Sanvictores 1986), como alguicida (Lee *et al.* 1994), y como un componente para mantener las superficies limpias (Parr *et al.* 1998; Smith *et al.* 2002). Por tanto, hay un uso muy generalizado de este compuesto.

Su toxicidad es baja y se basa en la alteración de la bicapa fosfolipídica de las membranas celulares. No afecta a la dureza del agua. Su actividad bacteriostática o bactericida depende de su concentración y de las condiciones de la zona a desinfectar. Aunque no es muy probable que alcance niveles peligrosos cuando se realiza un uso normal del mismo, en ocasiones puede representar un peligro para los organismos acuáticos.

Por lo tanto, ambientes acuáticos, incluyendo agua dulce, estuarios y aguas marinas costeras, son a menudo contaminados con numerosos compuestos orgánicos e inorgánicos, entre los cuales se encuentra el cloruro de benzalconio (Kümmerer *et al.* 1997). La creciente presencia de contaminantes en general y de desinfectantes en particular, ha estimulado la realización de estudios sobre toxicidad en microorganismos acuáticos, para proteger y conservar el medio natural y toda su diversidad.

Las microalgas forman parte de los ecosistemas acuáticos tanto marinos como dulceacuícolas, constituyendo la base de las cadenas tróficas, por lo que cualquier efecto nocivo sobre ellas puede afectar a los niveles tróficos superiores alterando los ecosistemas. (De Lorenzo *et al.* 2002; Rioboo *et al.* 2007). Además, las microalgas poseen una alta sensibilidad frente a un

amplio grupo de contaminantes, tanto orgánicos como inorgánicos (Haglund 1997) y responden a ellos de forma rápida debido a su tiempo de generación corto (De Lorenzo *et al.* 2002; Rioboo *et al.* 2007). Estas características hacen de estos microorganismos unos buenos indicadores biológicos de contaminantes en medio acuáticos (Rosenström Lepistö, 1996).

Las especies de microalgas son comúnmente utilizadas para ensayos de toxicidad porque se adaptan fácilmente a las condiciones de laboratorio, son sensibles a compuestos químicos y tienen una capacidad de crecimiento rápido.

2. Objetivo

En razón de lo anteriormente expuesto, el objetivo general del presente trabajo es evaluar el potencial efecto tóxico del desinfectante cloruro de benzalconio sobre la microalga dulceacuícola *Scenedesmus quadricauda*.

Se estudia la toxicidad provocada por concentraciones relevantes de dicho desinfectante sobre *S. quadricauda*, sobre el crecimiento de los cultivos, la composición bioquímica, concretamente el contenido celular de pigmentos fotosintéticos, y la actividad celular.

3. Material y métodos

3.1. Descripción de la microalga dulceacuicola utilizada

La especie seleccionada para el presente estudio es *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brebisson, una especie de microalga verde dulceacuícola, que se incluye en la división *Chlorophyta*, clase *Chlorophyceae*, orden *Sphaeropleales*.

Esta especie es capaz de formar cenobios, en los cuales las células del centro son cilíndricas y rectangulares, mientras que las de los extremos son más convexas (Komárek y Fott 1983). Además, estas células externas poseen dos espinas de longitud similar a la de la célula, y que se proyectan hacia fuera con un ángulo de 45° (Ortega-Mayagoitia y Rojo 2000).

Como ya se ha mencionado, 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 dispersarse como organismos unicelulares independientes. La morfología de las células y la formación de las espinas están determinadas por las condiciones químicas del medio en que se encuentran (Shubert y Trainos 1974).

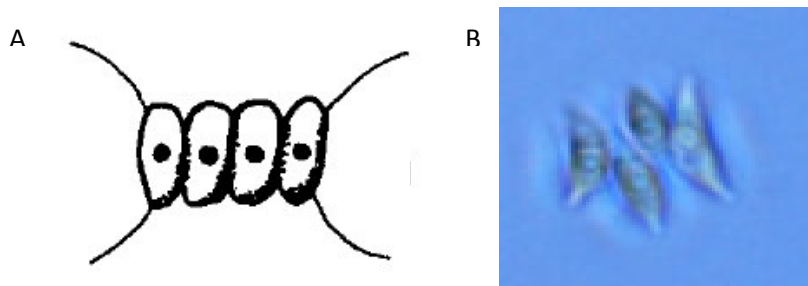


Figura 1: Esquema (A) (Komárek y Fott 1983) y fotografía (B) de *Scenedesmus quadricauda* (cenobio de 4 células).

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

3.2. Cultivo microalgal

Los cultivos de *S. quadricauda* se realizan en medio Bristol (Brown *et al.* 1967), cuya formulación de macronutrientes es la siguiente:

CaCl ₂ ·2H ₂	25 mg L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75 mg L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	75 mg L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	175 mg L ⁻¹
NaCl	25 mg L ⁻¹
NaNO ₃	25 mg L ⁻¹

El medio de cultivo se prepara en un litro de agua destilada natural y, una vez preparado, se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos. A esta mezcla de macronutrientes se le añaden, en condiciones de esterilidad, 3 mL L⁻¹ de una solución “stock” de oligoelementos (Fabregas *et al.* 1984) para obtener las siguientes concentraciones finales de micronutrientes:

Tiamina	35 µg L ⁻¹
Biotina	5 µg L ⁻¹
Vitamina B ₁₂	3 µg L ⁻¹
Citrato férrico	20 µM
ZnCl ₂	1 µM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1 µM
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1 µM
CoCl ₂	0.1 µM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.1 µM

Esta solución “stock” de oligoelementos se prepara añadiendo 0.5 g de Algal (Nutrición Avanzada S.A.) en 100 ml de agua destilada. Posteriormente, se mezclan las soluciones en condiciones de esterilidad y el medio completo se almacena refrigerado a 4°C en oscuridad.

Los cultivos “stock” se realizan en botellas Pyrex de 2L y se mantienen en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas de luz y temperatura. La iluminación, de 68.25 µmol fotón m² 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 durante todo el experimento.

3.3. Desinfectante

El cloruro de benzalconio o cloruro de alquildimetilbencilamonio, es un compuesto de amonio cuaternario que posee propiedades surfactantes y es hidrosoluble. Es un agente antimicrobiano utilizado para la desinfección y para detener la propagación de algas.

Pertenece al grupo de los tensioactivadores catiónicos, que se caracterizan por tener un grupo cargado positivamente, pero para mantener la neutralidad eléctrica de la molécula, éste está asociado a un anión. Por lo tanto, es un compuesto bipolar formado por una parte polar (grupo amonio cuaternario) y una parte apolar (grupos alquilos).

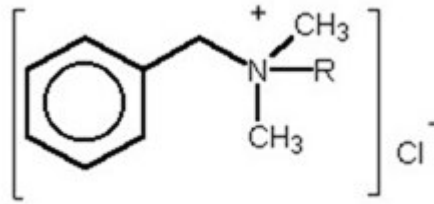


Figura 2: Estructura molecular del cloruro de benzalconio.

Es de color blanco, de tacto jabonoso y olor aromático. Es soluble en etanol y en agua pero poco soluble en benceno y casi insoluble en éter. Si agitamos su solución acuosa podemos observar la aparición de espuma.

El mecanismo de toxicidad de este compuesto se basa en su carácter anfipático. Las cadenas carbonatadas (hidrófobas) penetran en las membranas celulares, y el nitrógeno catiónico (hidrófilo) interacciona con los fosfatos de los fosfolípidos, alterando así la bicapa fosfolipídica (Eich *et al.* 2000). Su toxicidad es baja y no afecta a la dureza del agua. Su actividad bacteriostática o bactericida depende de su concentración y de las condiciones de la zona a desinfectar.

La solución “stock” se realiza en una botella Pyrex de 500 mL, en la cual se diluyen 8 mg de cloruro de benzalconio en 20 ml de agua destilada, obteniendo una concentración final de 400 mg L⁻¹.

3.4. Crecimiento

3.4.1. Densidad óptica

El crecimiento de los cultivos de *S. quadricauda* se determina mediante la medida de densidad óptica. Se toman alícuotas (2ml) de los cultivos y se realizan lecturas de absorbancia a 530 nm de longitud de onda utilizando un espectrofotómetro *Shimadzu UV- 1700*, frente a un blanco de agua destilada (Griffiths *et al.* 2011).

3.4.2. Recuento del número de células

La densidad celular (células mL⁻¹) de los cultivos de *S. quadricauda* se determina mediante recuentos realizados al microscopio óptico utilizando una cámara Improved Neubauer, empleando una alícuota de cada uno de los cultivos. Se utiliza un microscopio óptico de contraste de fases Nikon Labophot. En caso de muestras muy concentradas se efectúan las diluciones necesarias.

3.4.3. Parámetros de crecimiento

A partir de los datos de densidad celular, se calcula la tasa de crecimiento (μ) de *S. quadricauda*:

$$\mu = (\ln (N_f) - \ln (N_0)) / \ln 2 (t_f - t_0)$$

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

A partir los datos de densidad óptica, se calcula el porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. quadricauda*:

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

donde, C y T son el número de células por mL⁻¹ del control y de cada tratamiento con diferentes concentraciones del desinfectante, respectivamente.

La concentración efectiva media (*Effective Concentration 50 %*; EC₅₀), es decir la concentración de la sustancia estudiada que provoca una disminución del crecimiento del 50 % con respecto al control, se obtiene mediante la interpolación grafica en las curvas de concentración–respuesta (Walsh *et al.* 1987). Los datos para obtener la EC₅₀ se ajustan mediante una regresión no lineal, usando una curva logística. El cálculo de la EC₅₀ se lleva a cabo a las 192 horas.

3.5. Determinación espectrofotométrica de pigmentos fotosintéticos

Para el análisis espectrofotométrico del contenido en pigmentos fotosintéticos (clorofila a, clorofila b y carotenoides totales) de *S. quadricauda*, se centrifuga un volumen determinado de cada cultivo (10mL) en una centrífuga refrigerada ALC PK121R a 3500 g durante 20 min a 4°C, para recoger las células. A continuación, se retira el sobrenadante y la biomasa se resuspende en 2mL de acetona-metanol (2:1) para la extracción de los pigmentos. Se mantienen de este modo durante 24 h a 4 °C y en condiciones de oscuridad para que la extracción sea completa.

Tras este periodo de tiempo, el extracto 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) y de la microalga empleada. De los propuestos hasta ahora, se han adoptado los de Jeffrey y Humphrey (1975) para las clorofilas y los de Parsons y Strickland (1972) para los carotenoides, ambos usando acetona-metanol 2:1 como solvente.

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

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

$$\text{Clorofila } b = 20.36 A_{647} - 5.5 A_{664}$$

$$\text{Carotenoides totales} = 4 A_{480}$$

donde, las concentraciones de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales se expresan en $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extracto y A_{664} , A_{647} y A_{480} representan las absorbancias medidas a 664, 647 y 480 nm, respectivamente.

3.6. Análisis de la actividad celular

La fluoresceína presenta un anillo central y dos lugares de sustitución que pueden estar ocupados por diferentes radicales; en el caso del diacetato de fluoresceína (fluorescein diacetate, FDA) son dos radicales de acetato. El FDA 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 citoplasmáticas no específicas hidrolizan los enlaces éster de la molécula perdiendo así los residuos de acetato. La fluoresceína libre resultante es una molécula polar, hidrofílica, que emite fluorescencia en el espectro del verde cuando se excita con luz azul (488 nm) y que es retenida por las células cuando la membrana plasmática está intacta.

En caso de la ausencia de fluorescencia verde de la fluoresceína en células viables (con la membrana celular intacta), indica 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 fluorescencia emitida por las células metabólicamente activas, se pueden detectar posibles alteraciones de la actividad celular.

Para la medida de la actividad celular, se analiza la producción de fluorescencia mediante un ensayo espectrofotométrico. Se tomaron por duplicado alícuotas (de 4 mL) de cada cultivo a las que se añadió FDA a una concentración final de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

- A una de las réplicas se le añade inmediatamente acetona (concentración final de 50% v/v) para parar la reacción y se guarda a 4°C y en condiciones de oscuridad.
- La otra réplica se incuba a temperatura ambiente durante el tiempo suficiente (4 días). Tras la incubación, se añade acetona (concentración final de 50% v/v) para parar la reacción.

Ambas suspensiones celulares después de la incubación en las condiciones indicadas, se centrifugan en una centrífuga refrigerada ALC PK121R a 3.500 rpm durante 20 min a 4°C y se mide la absorbancia de los sobrenadantes a 490 nm en un espectrofotómetro *Shimadzu UV-1700* a 595 nm frente a un blanco de agua destilada.

Para obtener el valor de absorbancia real después del tiempo de incubación (t_i) se resta la absorbancia obtenida en tiempo 0. Se calcula la actividad celular del extracto a partir de una recta patrón realizada con concentraciones de fluoresceína entre $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente a un blanco de agua destilada. Los resultados de actividad se expresan en μg de fluoresceína por ml de cultivo y por hora.

3.7. Diseño experimental

Para evaluar el potencial efecto tóxico del cloruro de benzalconio sobre la microalga dulceacuicola *S. quadricauda* se llevaron a cabo experiencias de 192 horas (8 días) de duración en las cuales las células fueron expuestas a distintas concentraciones de cloruro de benzalconio: 0.25 mg L^{-1} , 0.5 mg L^{-1} , 1 mg L^{-1} , 2 mg L^{-1} y 4 mg L^{-1} . También, se realizaron controles sin cloruro de benzalconio. Se prepararon tres réplicas de cada concentración y del control.

En todas las experiencias, la densidad celular inicial de los cultivos fue $3 \cdot 10^5$ células mL^{-1} a partir de un inóculo en fase exponencial.

Los cultivos se realizaron en tubos Kimax conteniendo 45 ml de cultivo y se mantuvieron sin aireación en las mismas condiciones de luz y temperatura descritas anteriormente para los cultivos “stock”.

Cada 24 horas se tomaron muestras y se midió la absorbancia a 530nm de cada uno de los cultivos para la determinación del crecimiento. También, se realizaron recuentos celulares de los tubos control diariamente. Pasadas 192 horas se realizaron los recuentos celulares de todos los cultivos y se analizaron los pigmentos fotosintéticos y la actividad celular.

3.8. Análisis estadístico

Se calcularon las medias y las desviaciones estándar de los valores obtenidos en cada tratamiento y en los controles. Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el programa IBM SPSS Statistic versión 20.0.

En cada ensayo, la hipótesis de que la concentración de desinfectante del medio no afecta al parámetro de estudio se analizó mediante análisis de la varianza de una vía (ANOVA) a un nivel de confianza del 95%. Cuando la hipótesis era rechazada, se utilizó el test de rango múltiple de Tukey para analizar de qué forma afecta cada concentración de desinfectante al parámetro estudiado. Este test se aplicó en todos los casos al nivel de significación 0.05 ($p < 0.05$).

Las gráficas se realizaron con el paquete de análisis estadístico y de gráficas avanzadas SigmaPlot versión 12.0. En las tablas y figuras, los resultados se expresan como la media de los valores obtenidos \pm desviación estándar.

4. Resultados y discusión

4.1. Crecimiento

En los últimos años se han desarrollado bioensayos basados en nuevos parámetros y métodos cada vez más rápidos, sencillos, prácticos y sensibles para detectar contaminantes y estudiar su toxicidad. Aun así, el crecimiento sigue siendo el parámetro más utilizado hasta la fecha para analizar los efectos de compuestos tóxicos sobre la microalgas en ensayos de toxicidad (Van Wezel y Van Vlaardingen, 2004). Por lo tanto, el crecimiento fue uno de los parámetros estudiados para determinar la toxicidad del cloruro de benzalconio sobre *Scenedesmus quadricauda*.

La determinación de la densidad celular o el número de células son usadas como medida del crecimiento microalgal. Algunos estudios concluyen que es menos sensible que otros como la morfología celular o la producción de pigmentos fotosintéticos (Geoffroy *et al.* 2007), pero otros autores indican que el crecimiento es el parámetro más sensible dentro de los estudiados (Franklin *et al.* 2001; Strom *et al.* 2009), aunque esto depende del organismo, del contaminante y de los parámetros de estudio.

En relación a los cultivos expuestos al desinfectante, los resultados reflejan que el crecimiento de *S. quadricauda* se vio afectado por la presencia de cloruro de benzalconio en el medio (Figura 3).

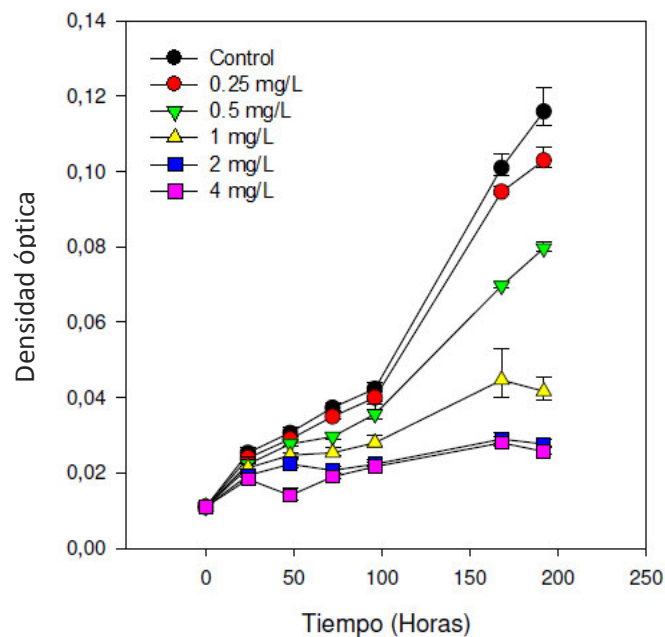


Figura 3: Curvas de crecimiento de los cultivos de *S. quadricauda* en ausencia del desinfectante (control) y expuestos a diferentes concentraciones de cloruro de benzalconio. Los valores representados son los valores medios de las réplicas de los cultivos \pm desviación estándar de las medias.

Los resultados muestran que las concentraciones de desinfectante iguales o superiores a 0.5 mg L⁻¹ tuvieron un efecto negativo sobre el crecimiento de *S. quadricauda* con respecto al control; estas diferencias son significativas.

También se observó un efecto negativo del cloruro de benzalconio en especies de microalgas marinas como *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis* expuestas a concentraciones comprendidas entre 15-200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Pérez *et al.* 2009); estas concentraciones se asemejan a las concentraciones más bajas de desinfectante utilizadas en este trabajo.

El porcentaje de inhibición del crecimiento aumenta al aumentar la concentración de cloruro de benzalconio, considerando el crecimiento del cultivo control como el 0%. (Figura 5)

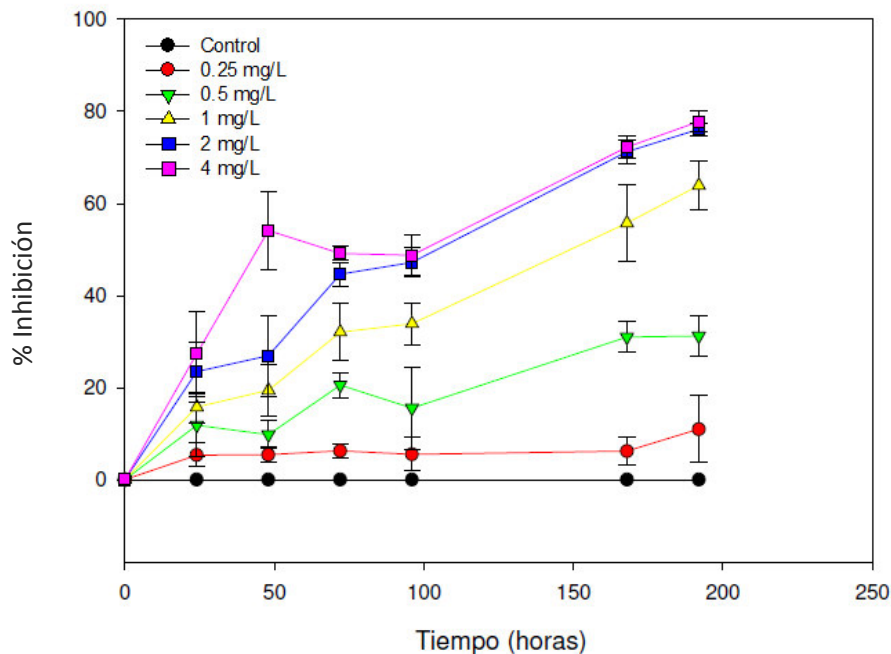


Imagen 5: Inhibición del crecimiento producido por distintas concentraciones de cloruro de benzalconio, considerando el crecimiento del cultivo control como el 0%. Los valores representados son los valores medios de las tres replicas réplicas de los cultivos \pm desviación estándar de las medias.

En los cultivos con cloruro de benzalconio en el medio, el crecimiento se ve inhibido. Al aumentar el tiempo de exposición, las diferencias entre los cultivos con tratamiento y el control aumenta, existiendo diferencias significativas en los cultivos con concentraciones superiores a 0.5 mg L^{-1} de dicho desinfectante.

En muchos ensayos, la toxicidad se mide en función de la reducción de la tasa de crecimiento. (Hogan *et al.* 2005; Debelius *et al.* 2008; Nie *et al.* 2009; Pereira *et al.* 2009; Strom *et al.* 2009). Es por ello que se calculó la tasa de crecimiento de los cultivos expuestos al cloruro de benzalconio, así como de los controles (Tabla 1).

Al aumentar la concentración de desinfectante se produce una disminución en la tasa de crecimiento. Las diferencias entre los cultivos tratados con cloruro de benzalconio y el control son significativas a concentraciones iguales o superiores a 0.5 mg L^{-1} .

Cultivo	Tasa de crecimiento
Control	0.50 ± 0.054
0.25 mg L^{-1}	0.47 ± 0.049
0.5 mg L^{-1}	0.33 ± 0.035
1 mg L^{-1}	0.001 ± 0.0003
2 mg L^{-1}	0
4 mg L^{-1}	0

Tabla 1: Tasas de crecimiento del cultivo control y de los cultivos tratados con desinfectante. Los valores representados se corresponden con la media de las tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar.

La Figura 4 muestra los valores de densidad celular alcanzada por *S. quadricauda* tras 192 horas de cultivo. El número de células aumentó exponencialmente hasta alcanzar una densidad final de $89 \pm 10.14 \cdot 10^4$ células mL^{-1} en el cultivo control. Los valores de densidad descienden significativamente a medida que aumenta la concentración de cloruro de benzalconio, llegando a tener una densidad celular de $19.66 \pm 0.5 \cdot 10^4$ células mL^{-1} en el cultivo tratado con 4 mg L^{-1} de cloruro de benzalconio en el medio.

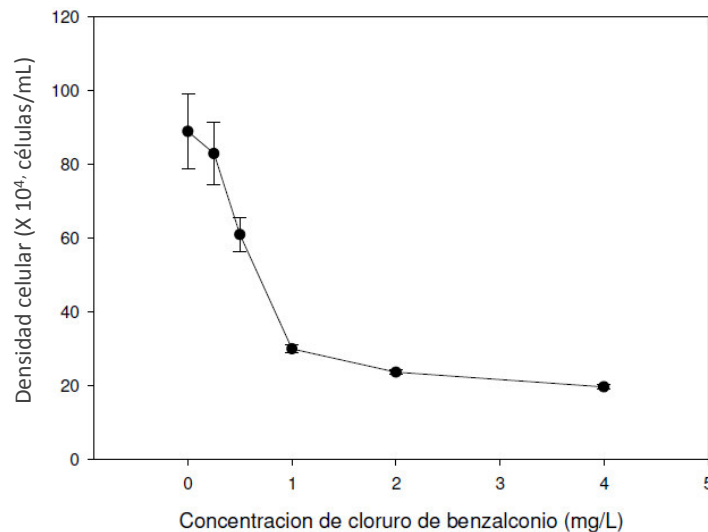


Figura 4: Densidad celular de los cultivos de *S. quadricauda* tras 192 horas de exposición a diferentes concentraciones de cloruro de benzalconio. Los valores representados son los valores medios de las tres réplicas de los cultivos \pm desviación estándar de las medias.

La EC_{50} para el crecimiento (concentración efectiva) después de una exposición de 192 horas a cloruro de benzalconio fue de 3.75 mg L^{-1} . Es decir, 3.75 mg L^{-1} es la concentración de desinfectante que provoca una disminución del crecimiento del 50 % con respecto al control.

Valores de EC_{50} descritos para el cloruro de benzalconio en microalgas en estudios anteriores varían desde 73 mg L^{-1} en un ensayo de 120 horas con *Chaetoceros gracilis* (Pérez *et al.* 2009) a 0.96 mg L^{-1} en un ensayo de 72 horas con *Dictiosphaerium chlorelloides* (Sánchez-Fortún *et al.* 2007). El valor obtenido en este estudio se aproxima más a los valores descritos por Sánchez-Fortún *et al.* (2007) en *Scenedesmus intermedius* que a los descritos por Pérez *et al.* (2009) para *Chaetoceros gracilis*.

La similitud de *S. quadricauda* con *S. intermedius* sugiere que ambas especies tendrían una sensibilidad similar al efecto de este desinfectante.

La aparente mayor resistencia de *Chaetoceros gracilis* puede deberse a su capacidad para formar agregados al aumentar su densidad celular, lo que podría favorecer a las microalgas para protegerse de las sustancias tóxicas, ya que solo las células situadas en el exterior están en contacto directo con el cloruro de benzalconio. Este efecto ya se ha propuesto en experimentos con biopelículas bacterianas por Frank y Koffi (1990). Esta puede ser una razón por la cual *C. gracilis* tiene una EC_{50} mayor que *S. quadricauda*. Las diferencias encontradas entre *S. quadricauda* y *C. gracilis* en relación a la toxicidad del cloruro de benzalconio, también puede ser parcialmente explicadas por las diferentes características de la cubierta exterior de ambas especies, teniendo *C. gracilis* una cubierta más gruesa (Corre *et al.* 1996), lo que influye en la penetración de la molécula de tensioactivo en la célula. En general, se han observado tensioactivos que se unen en la pared celular y provocan una modificación de la permeabilidad de la membrana a los nutrientes y productos químicos (Lewis 1990). Lewis (1990) consideró el espesor de la pared celular como un factor clave en el impacto del tensioactivo en las microalgas.

Las diferencias en la respuesta de distintas microalgas ante el cloruro de benzalconio están de acuerdo con estudios previos de Yamane *et al* (1984) y Pavlić *et al* (2005) que establecen que las microalgas son muy variables en su sensibilidad a los tensioactivos.

Por otra parte, las células tratadas con cloruro de benzalconio presentan cambios morfológicos, bien apreciados a la mayor concentración ensayada (4 mg L^{-1}) donde formaron estructuras cilíndricas aisladas a diferencia de las células control que mostraban cenobios de 4 células (Figura 6).

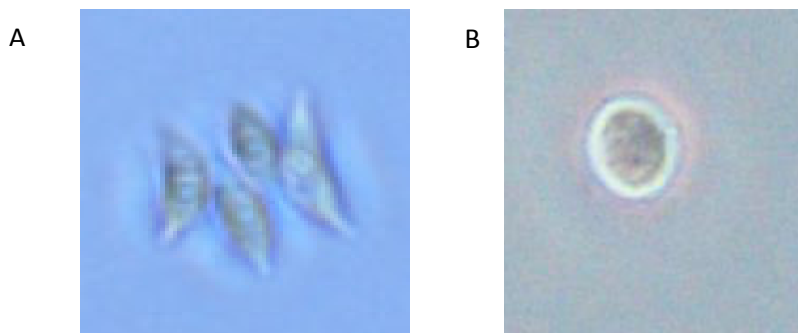


Figura 6: Imágenes tomadas mediante microscopio de fluorescencia de las células control y tratadas con cloruro de benzalconio. Se observa que las células forman cenobios de 4 células (A) y células cilíndricas (B).

Por lo tanto, el cloruro de benzalconio afecta a las tasas de crecimiento y a la estructura de la célula en *S. quadricauda*.

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 el contenido en pigmentos fotosintéticos y la actividad celular.

4.2. Pigmentos fotosintéticos

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 y Price 1993; Masojídek *et al.* 2000). Por ello, el contenido en pigmentos es utilizado como biomarcador de exposición de diversos tóxicos en microalgas (Couderchet y Vernet 2003).

La presencia de cloruro de benzalconio en los cultivos de *S. quadricauda* afectó al contenido de pigmentos fotosintéticos (Figura 7).

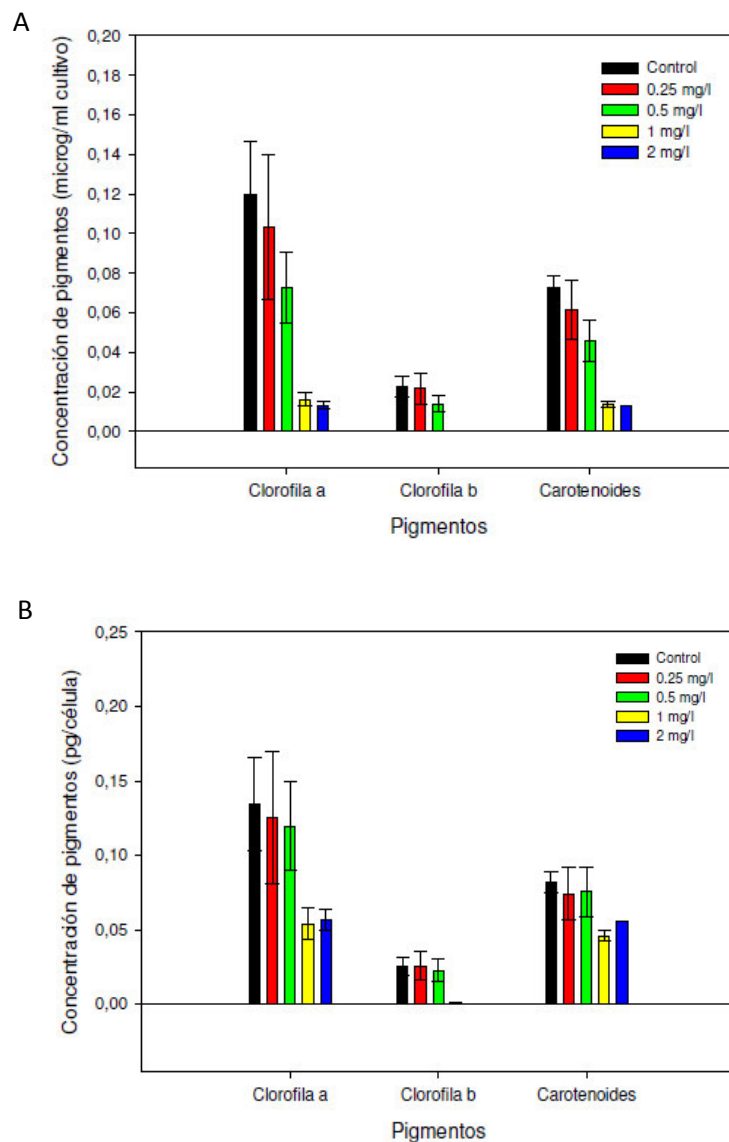


Figura 7: Concentración de pigmentos por mL de cultivo (A) y por célula (B) del cultivo control y de los cultivos con diferentes concentraciones de cloruro de benzalconio tras 192 horas de exposición. Los valores representados son los valores medios de las tres réplicas de los cultivos \pm desviación estándar de las medias.

Las concentraciones de clorofila a, clorofila b y carotenoides expresadas en $\mu\text{g mL}^{-1}$ disminuyen al aumentar la concentración de desinfectante a la que está expuesta *S. quadricauda* en los diferentes cultivos durante 192 horas. Las concentraciones celulares de clorofila a, clorofila b y carotenoides (pg célula^{-1}) también disminuyen al aumentar la concentración de cloruro de benzalconio pasado el mismo periodo de tiempo (Figura 7). En otras microalgas como *Isochrysis galbana* se observó este mismo efecto tras la exposición durante 120 horas a este compuesto (Pérez *et al.* 2009; Eich *et al.* 2000).

Tras 192 horas, el cultivo control presenta unos valores de clorofila a de $0.119 \pm 0.04 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.13 \pm 0.05 \text{ pg célula}^{-1}$, mientras que en los cultivos con desinfectante estas concentraciones varían desde $0.103 \pm 0.06 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.125 \pm 0.07 \text{ pg célula}^{-1}$ en el cultivo con 0.25 mg L^{-1} de desinfectante hasta $0.013 \pm 0.002 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.05 \pm 0.01 \text{ pg célula}^{-1}$ en el cultivo con 2 mg L^{-1} de desinfectante. Con respecto a los valores de clorofila b que encontramos en el cultivo control son menores a los de clorofila a, $0.023 \pm 0.009 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.025 \pm 0.01 \text{ pg célula}^{-1}$, y en los cultivos con desinfectante varía desde $0.021 \pm 0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.02 \pm 0.01 \text{ pg célula}^{-1}$ en el cultivo con 0.25 mg L^{-1} de desinfectante hasta $0.014 \pm 0.007 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.02 \pm 0.01 \text{ pg célula}^{-1}$ en el cultivo con 0.5 mg L^{-1} de desinfectante. El cultivo control presenta unos valores de carotenoides totales de $0.072 \pm 0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.08 \pm 0.01 \text{ pg célula}^{-1}$ pero en los cultivos con desinfectante varía entre $0.061 \pm 0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.07 \pm 0.03 \text{ pg célula}^{-1}$ en el cultivo con 0.25 mg L^{-1} de desinfectante hasta $0.013 \pm 0 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.05 \pm 0 \text{ pg célula}^{-1}$ en el cultivo con 2 mg L^{-1} de desinfectante.

Tanto si se expresan por unidad de volumen de cultivo como por concentración celular, los resultados muestran que una concentración de cloruro de benzalconio de 1 mg L^{-1} redujo significativamente ($p < 0.05$) el contenido en clorofila a, clorofila b y carotenoides totales en *S. quadricauda* con respecto a los cultivos control, después de 192 horas de exposición. Sin embargo, concentraciones de 0.25 mg mL^{-1} y 0.5 mg mL^{-1} de desinfectante, no produjeron variaciones significativas ($p < 0.05$) con respecto al control. La reducción en el contenido celular de los pigmentos podría deberse a que el cloruro de benzalconio afecta al aparato fotosintético de las células de la microalga. La concentración de pigmentos fotosintéticos de los cultivos de la microalga expuesta a 4 mg L^{-1} de desinfectante no pudieron ser determinados debido a que no entraban en el umbral de medida. Ocurre lo mismo en el caso de la clorofila b en los cultivos expuestos a 1 mg L^{-1} y 2 mg L^{-1} de cloruro de benzalconio.

La reducción en el contenido en pigmentos fotosintéticos puede deberse al mecanismo de acción del cloruro de benzalconio. Walker y Evans (1978) sugirieron que la causa de este efecto se encuentra en la alteración de la organización, estabilidad, o fluidez de la membrana tilacoidal, al exponer *Chlorella* a compuestos de amonio cuaternario.

Las relaciones entre pigmentos 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), por lo que calculamos la relación entre el contenido en clorofila a y clorofila b en los distintos cultivos (Figura 8).

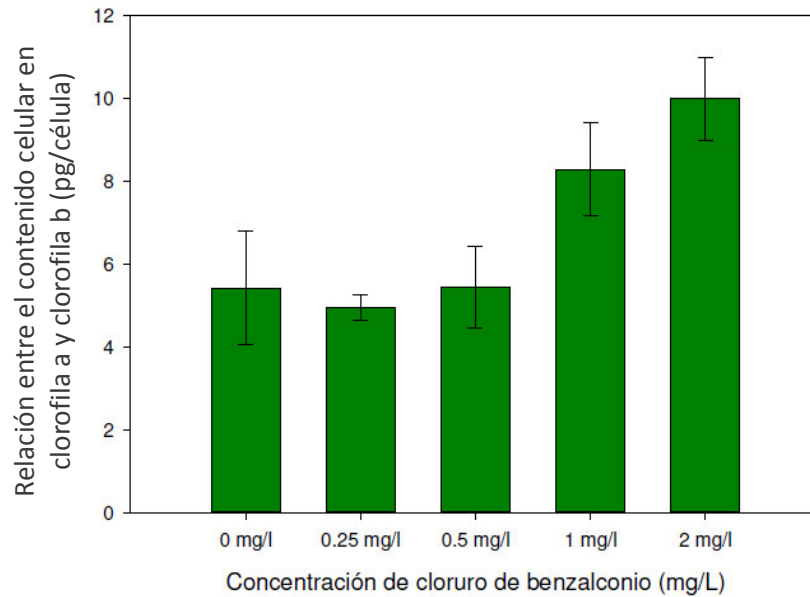


Figura 8: Variación en la relación en clorofila a y clorofila b en el cultivo control y los cultivos expuestos a diferentes concentraciones de cloruro de benzalconio tras 192 horas de exposición. Los valores representados son los valores medios de las tres réplicas de los cultivos \pm desviación estándar de las medias.

Al aumentar la concentración de cloruro de benzalconio existe una tendencia a aumentar la relación entre la clorofila a y la clorofila b en los cultivos de *S. quadricauda*. Existen diferencias significativas entre el cultivo control y el cultivo tratado con 2 mg L^{-1} de desinfectante.

4.3. Actividad celular

La medida de inhibición de la actividad enzimática en microalgas es un indicador rápido y sensible de estrés ambiental (Blaise y 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 y Duncan 2001; Breeuwer *et al.* 1995).

Al aumentar la concentración de cloruro de benzalconio se produce una disminución significativa de la actividad metabólica de las células medida en función de la actividad esterasa (Figura 9).

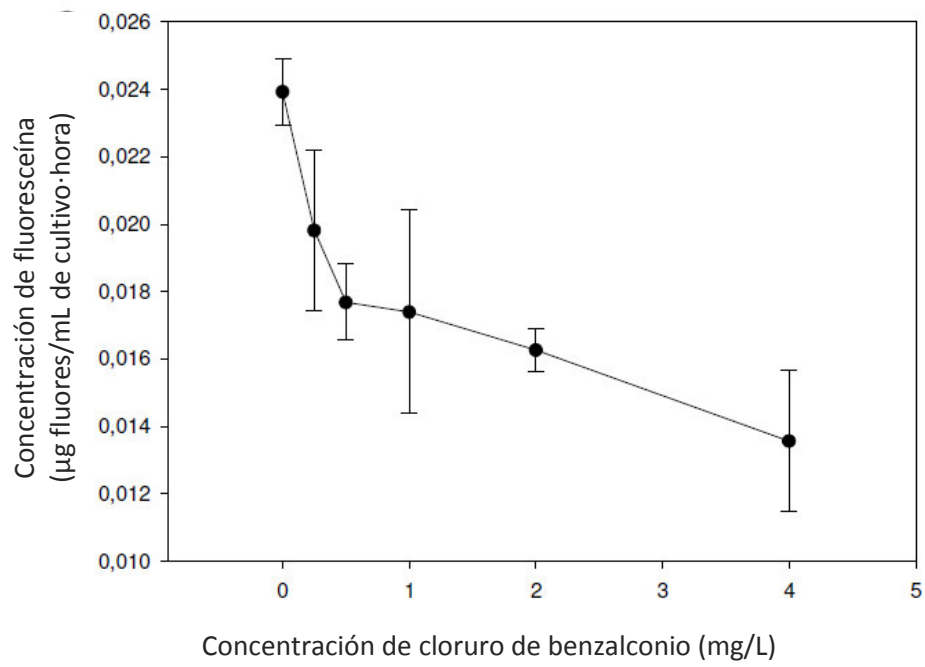


Figura 9: Actividad metabólica de *S. quadricauda* en el cultivo control y los cultivos expuestos a diferentes concentraciones de cloruro de benzalconio tras 192 horas de exposición. Los valores representados son los valores medios de las tres réplicas de los cultivos \pm desviación estándar de las medias.

5. Conclusiones

1. El desinfectante cloruro de benzalconio afecta al crecimiento de la microalga dulceacuícola *S. quadricauda*, siendo este efecto dependiente de la concentración. La EC₅₀ a las 192 horas de exposición es 3.75 mg L⁻¹.
2. El contenido de pigmentos fotosintéticos de *S. quadricauda* desciende tras la exposición a este desinfectante, pudiendo repercutir negativamente en la fotosíntesis.
3. La actividad celular, medida en función de la actividad esterasa, también se ve afectada por la presencia de cloruro de benzalconio en el medio.

Conclusions

1. Growth of freshwater microalga *S. quadricauda* was affected by the presence of the disinfectant benzalkonium chloride and this effect was concentration dependent. The EC₅₀ at 192 hours of exposure was 3.75 mg L⁻¹.
2. Benzalkonium chloride provoked a decrease in the photosynthetic pigments content of *S. quadricauda* may adversely affect to the photosynthesis.
3. Cellular activity, measured as esterase activity, was also affected by the presence of benzalkonium chloride in the medium.

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 Biology and Biochemistry*, 33: 943-951.
- Blaise C. & Ménard L. (1998). A micro-algal solid phase test to assess the toxic potential of freshwater sediments. *Water Quality Research Journal of Canada*, 33: 133-151.
- Breeuwer P., Drocourt J. L., Bunschoten N., Zwietering M. H., Rombouts, F. M. & Abee, T. (1995). Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Applied Environmental Microbiology*, 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.
- 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. 614 pp.
- Corre G., Templier J., Largeau C., Rousseau B., & Berkaloff C. (1996). Influence of cell wall composition on the resistance of two *Chlorella species* (Chlorophyta) to detergents. *Journal of Phycology*, 32: 584-590.
- Couderchet M. & Vernet G. (2003). Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 55: 271-277.
- De Lorenzo M. E., Taylor L. A., Lund S. A., Pennington P. L., Stroizer D. E. & Fulton M. H. (2002). Toxicity and bioconcentration potential of the agricultural pesticide endosulfan in phytoplankton and zooplankton. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 81: 159-167.
- Debelius B., Forja J. M., Del Vals A. & Lubián L. M. (2008). Effect of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and atrazine on marine microalgae. *Marine Pollution Bulletin*, 57: 559-568.
- Donowitz L. G. (1991). Benzalkonium chloride is still in use. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 12: 186-188.
- Eich J., Dürholt H., Steger-Hartmann T., & Wagner E. (2000). Specific detection of membrane-toxic substances with a conductivity assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45: 228-235.
- Fabregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. y Veiga, M. (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, 42: 207-215.
- Frank J. F. & Koffi R. A. (1990). Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection*, 53: 550-554.
- Franklin N. M., Adams M. S., Stauber J. L. & Lim R. P. (2001 a). Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 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. *Environmental Toxicology Chemistry*, 20: 160-170.
- Geoffroy L., Gilbin R., Simon O., Floriani M., Adam C., Pradines C., Cournac L. & Garnier-Laplace J. (2007). Effect of selenate on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, 83: 149-158.

- Griffiths M.J., Garcin C., Van Hille R.P. & Harrison S. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85: 119-123.
- Haglund K. (1997). The use of algae in aquatic toxicity assessment. *Progress in Phycological Research*, 12: 181-212.
- Hendry G. A. F. & Price A. H. (1993). Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: Hendry GAF, Grime JP (eds), *Methods in comparative plant ecology*, pp 148-152. Chapman & Hall, London, UK.
- 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*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48: 433-443.
- Hoskins G. E., & Dalziel F. C. (1984). Survival of Chinook fry (*Oncorhynchus tshawytscha*) following exposure to benzalkonium chloride in soft water. *Progressive Fish-Culturist*, 26: 98-101.
- 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. *Science*, 64: 183-195.
- 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*. *Applied Environmental Microbiology*, 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*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84: 94-97.
- Komárek J. & Fott B. (1983) Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung Chlorococcales. *Nordic Journal of Botany*. 5 (1):111-112.
- Kümmerer K., Eitel A., Braun U., Hubner P., Daschner F., Mascart G., et al. (1997). Analysis of benzalkonium chloride in the effluent from European hospitals by solidphase extraction and high-performance liquid chromatography with post-column ion-pairing and fluorescence detection. *Journal of Chromatography. A*, 774: 281-286.
- Lee C. L., Chen I. M., & Fong S.-C. (1994). Effects of benzalkonium chloride on growth of phytoplankton. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan*, 21: 69-77.
- Lewis M. A. (1990). Chronic toxicities of surfactants and detergent builders to algae: a review and risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 20: 123-140.
- Lio-Po G. D., & Sanvictores E. G. (1986). Tolerance of *Penaeus monodon* eggs and larvae to fungicides against *Lagenidium sp* and *Haliphthoros philippinensis*. *Aquaculture*, 51: 161-168.
- Masojídek 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. *Journal of Applied Phycology*, 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.
- Ortega-Mayagoitia E. & Rojo C. (2000). Fitoplancton del Parque Nacional las Tablas de Daimiel. III. Diatomeas y Clorofitas. *Anales Jardín Botánico de Madrid*, 58: 17-37.
- Parr A. C. S., Smith M. J., Beveridge C. M., Kerr A., Cowling M. J., & Hodgkiess T. (1998). Optical assessment of a fouling-resistant surface (PHEMA/benzalkonium chloride) after exposure to a marine environment. *Advanced Materials for Optics and Electronics*, 8: 187-193.

- Parsons T. R. & Strickland J. D. H. (1965). Particulate organic matter. III. I. Pigment analysis. III. II. Determination of phytoplankton pigments. *Journal Fisheries Research Board of Canada*, 18: 117-127.
- Pavlič, Z., Vidaković-Cifrek, Ž., & Puntarić, D. (2005). Toxicity of surfactants to green microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Scenedesmus subspicatus* and to marine diatoms *Phaedactylum tricornutum* and *Skeletonema costatum*. *Chemosphere*, 61: 1061–1068.
- 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.
- Pérez P., Fernández E. & Beiras R. (2009). Toxicity of Benzalconium Chloride on Monoalgal Cultures and Natural Assemblages of Marine Phytoplankton. *Water Air Soil Pollut*, 201: 319-330.
- Petrovic M., Gonzales S. & Barcelo D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends in Analytical Chemistry*, 22(10): 685-696
- 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 bioassay of environmental degradation in a freshwater creek. *Aquatic Toxicology*, 59: 209-223.
- Rioboo C., Prado R., Herrero C. & Cid A. (2007). Population growth study of the rotifer *Brachionus sp.* fed with triazine-exposed microalgae. *Aquatic Toxicology*, 83: 247-253.
- Rosenström U. & Lepistö L. (1996). Phytoplankton indicator species of different types of boreal lakes. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.* 116: 131-140.
- Sánchez- Fortún S., Marvá F. & D'ors A. (2008). Inhibition of growth and photosynthesis of selected green microalgae as tools to evaluate toxicity of dodecylethyldimethyl-ammonium bromide. *Ecotoxicology*, 17: 229-234.
- Shubert L. E. & Trainor F. R. (1974). *Scenedesmus* morphogenesis. Control of the unicell stage with phosphorus. *British Phycological Journal*, 9: 1-7.
- Smith M. J., Adam G., Duncan H. J., & Cowling M. J. (2002). The effects of cationic surfactants on marine biofilm growth on hydrogels. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55, 361–367.
- Strickland J. D. & Parsons T. R. (1972). A Practical Handbook of Seawater Analysis. 2^a ed. Fisheries Research Board of Canada. Ottawa, 310pp.
- Strom D., Ralph 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.
- Thorsteinsson T., Loftsson T., & Masson M. (2003). Soft antibacterial agents. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 1241–1253.
- Van Wezel A. P. & van Vlaardingen P. (2004). Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquatic Toxicology*, 66: 427-444.
- Walker J. R. L., & Evans S. (1978). Effect of quaternary ammonium compounds on some aquatic plants. *Marine Pollution Bulletin*, 9: 136–137.
- Walsh G. E., Deans C. H. & McLaughlin M. J. (1987). Comparison of the EC50s of algal toxicity tests calculated by four methods. *Environmental Toxicology Chemistry*, 6: 767-770.
- Yamane A., Okada M., & Sudo R. (1984). The growth inhibition of planktonic algae due to surfactants used in washing agents. *Water Research*, 18: 1101–1105.

7. Agradecimientos

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutora, M^a Concepción Herrero López, sin la cual no hubiera sido posible realizar este trabajo. Muchas gracias por su ayuda, paciencia, apoyo y sobre todo por compartir sus conocimientos conmigo.

Asimismo, agradezco a todo el personal del Laboratorio de Microbiología por brindarme una mano cuando fue necesario y al Departamento de Microbiología por proporcionarnos la microalga *S. quadricauda* y todo el material de laboratorio utilizado.

También aprovecho para dar las gracias a todas las personas que han sido y son un apoyo durante estos años: a mis amigos de la facultad por aceptarme con los brazos abiertos y ayudarme siempre, a Julián por estar a mi lado en cada momento y sacarme una sonrisa cuando más lo necesitaba, y en especial a mis padres y mis abuelos, por confiar en mí y darme la oportunidad de llegar hasta aquí.