



UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR

ÁREA DE MICROBIOLOGÍA

Toxicidad del cobre sobre la diatomea marina
Phaeodactylum tricornutum Bohlin

ANGELES CID BLANCO

Noviembre, 1993



UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR

ÁREA DE MICROBIOLOGÍA

Toxicidad del cobre sobre la diatomea marina
***Phaeodactylum tricornutum* Bohlin**

Memoria que para optar al
Grado de Doctor presenta
ANGELES CID BLANCO

Noviembre, 1993

CONCEPCION HERRERO LOPEZ, Profesora Titular de Microbiología del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de La Coruña,

INFORMA: que la licenciada en Ciencias Biológicas y alumna de Tercer Ciclo del programa de Doctorado de Biología Ambiental **D^a Angeles Cid Blanco**, ha realizado en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de La Coruña, bajo mi dirección y la del Prof. Julio E. Abalde Alonso, el trabajo que con el título **Toxicidad del cobre sobre la diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin** presenta para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste, firmo el presente en La Coruña a 14 de Octubre de 1993.



Fdo. Profa. Dra. Concepción Herrero López

*"Nada que se consiga sin pensar y sin trabajo es
verdaderamente valioso"*

Joseph Addison

A mis padres

A Luis



Agradecimientos

A los Drs. Concepción Herrero y Julio Abalde, Concha y Julio, gracias por vuestro inestimable apoyo y estímulo, tanto en mi formación investigadora como humana, así como el enorme esfuerzo realizado para que este trabajo saliese adelante.

A Susana, gracias por ayudarme tanto en todo y no deprimirte conmigo. A Pablo, gracias por soportarme y ayudarme estos años, que no es poco. A Quique, gracias por tu colaboración en este trabajo.

A Kitty le agradezco su trabajo con los pigmentos y al Dr. Jaime Fábregas la colaboración prestada durante todos estos años. A Ana Otero, gracias por la bibliografía suministrada. Al Dr. Manuel Varela, gracias por sus consejos y por el "carbono".

Al Prof. G. Valet del Max Planck Institute für Biochemie (München, Germany) y a los Drs. M. Sieracki, T. Cucci y D. Phynney del Bigelow Laboratory for Ocean Sciences (Maine, USA), gracias por su contribución en mi pequeña formación en citometría de flujo.

A mis amigos: Ana, por supuesto, y a María, Juanjo y Gelucho, gracias por las buenas horas que me habéis hecho pasar en el laboratorio y fuera de él, y por vuestro apoyo en todo momento.

A las chicas de Bioquímica, gracias por atender siempre mis "necesidades".

A los compañeros del laboratorio de Química Analítica, gracias por la ayuda prestada en los análisis de absorción atómica.

A mis padres mi más sincero y tierno agradecimiento. Por todo, gracias.

A Luis, gracias por estar siempre a mi lado, sin ti "esto" no hubiese sido realidad nunca.

Por último, deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han convivido conmigo en el Departamento y fuera de él, haciendo que la realización de este trabajo tuviese el calor humano que toda labor conlleva.

A todos y por todo,

gracias.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada con la ayuda de una beca Predoctoral de la Xunta de Galicia y subvencionada a través de los proyectos de investigación concedidos por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT) (PB89-0546) y por la Consellería de Educación e Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia (XUGA-10302B90)

INDICE

INTRODUCCIÓN	13
Metales pesados	15
Incorporación de los metales pesados a nivel celular	21
Cobre: propiedades y aplicaciones	22
Distribución del cobre en la Naturaleza	24
Riesgos de la utilización del cobre	25
Toxicidad del cobre en las microalgas	26
Citometría de flujo	28
Estructura de la cámara de análisis de un citómetro de flujo	31
Tipos de parámetros celulares medibles en un citómetro de flujo	33
OBJETIVO	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
Descripción de la especie microalgal utilizada, <i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i> Bohlin	43
Cultivo de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	43
Preparación del material utilizado en las experiencias con metales	46
Crecimiento	47
Medida de la incorporación de ³ H-timidina	48
Determinación de la tasa de fotosíntesis	50
Determinación del ATP celular	52
Análisis de los pigmentos fotosintéticos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	53
Análisis morfológico y fisiológico por citometría de flujo	55
Tamaño, granularidad y autofluorescencia	58
Determinación de la viabilidad celular	59
Determinación del potencial transmembrana	60
Determinación del potencial de membrana mitocondrial	62
Determinación del pH intracelular	64
Determinación de la actividad peroxidasa	66
Determinación de la bioacumulación de cobre	67
Tratamiento de datos	68

RESULTADOS	69
Efecto de la densidad celular inicial sobre la toxicidad de cobre sobre la microalga marina <i>P. tricornutum</i>	71
Efecto de la presencia de cobre en el medio sobre la incorpo- ración de ³ H-Timidina por <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	83
Efecto del cobre sobre la tasa de fotosíntesis de la microalga marina <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	85
Efecto del cobre sobre el contenido celular de ATP en <i>Phaeo-</i> <i>dactylum tricornutum</i>	89
Efecto del cobre sobre la composición relativa de los pigmentos fotosintéticos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	91
Efecto de distintas concentraciones de cobre sobre el volumen y granularidad celular de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	97
Estudio de la autofluorescencia celular en cultivos de <i>Phaeo-</i> <i>dactylum tricornutum</i> expuestos a diferentes concentracio- nes de cobre	105
Estudio de la viabilidad celular en cultivos de <i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i> expuestos a diferentes concentraciones de cobre	109
Actividad peroxidasa en células de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> sometidas a distintas concentraciones de cobre	113
Efectos del cobre sobre los potenciales de membrana citoplas- mática y mitocondrial de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	117
Variación en el pH intracelular de las células de <i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i> cultivada con distintas concentraciones de cobre	123
Bioacumulación de cobre en <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	127
Variación del efecto tóxico del cobre sobre <i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i> debido a la presencia de Zinc, Hierro y Cadmio en el medio de cultivo	133
DISCUSIÓN	145
CONCLUSIONES	171
BIBLIOGRAFÍA	175

Localización de Figuras, Fotografías y Tablas

Figuras	página		
Figura 1	17	Figura 36	129
Figura 2	31	Figura 37	129
Figura 3	33	Figura 38	130
Figura 4	56	Figura 39	137
Figura 5	74	Figura 40	137
Figura 6	74	Figura 41	138
Figura 7	75	Figura 42	138
Figura 8	75	Figura 43	139
Figura 9	76	Figura 44	139
Figura 10	79	Figura 45	140
Figura 11	80	Figura 46	142
Figura 12	80	Figura 47	142
Figura 13	84	Figura 48	143
Figura 14	86	Figura 49	143
Figura 15	87	Figura 50	153
Figura 16	90		
Figura 17	92	Fotografías	página
Figura 18	93	Foto 1	45
Figura 19	95	Foto 2	151
Figura 20	95		
Figura 21	99		
Figura 22	100		
Figura 23	102	Tablas	página
Figura 24	103	Tabla I	34
Figura 25	106	Tabla II	77
Figura 26	107	Tabla III	81
Figura 27	108	Tabla IV	88
Figura 28	111	Tabla V	99
Figura 29	114	Tabla VI	110
Figura 30	115	Tabla VII	119
Figura 31	120	Tabla VIII	125
Figura 32	121	Tabla IX	130
Figura 33	122	Tabla X	131
Figura 34	124	Tabla XI	136
Figura 35	126		



Introducción

El término **polución** hace referencia a la presencia en la atmósfera o las aguas, tanto continentales como marinas, de subproductos de la actividad humana que las contaminan y/o provocan desequilibrios en los ecosistemas naturales. Los agentes contaminantes alteran la estructura de estos ecosistemas, provocando cambios en las comunidades bióticas. Las sustancias tóxicas más importantes que aparecen en las aguas son: metales pesados, sulfuros, cianuros, hidrocarburos clorados, fenoles y otras sustancias orgánicas. El deterioro de los ecosistemas acuáticos por estos contaminantes es un problema actual. La principal fuente de sustancias biopeligrosas o contaminantes para las masas de agua son los vertidos industriales y efluentes de origen agrícola. A elevadas concentraciones algunas de estas sustancias pueden causar la muerte de animales y plantas. A bajas concentraciones, algunas de estas sustancias no provocan efectos agudos sobre los organismos acuáticos, pero pueden acumularse progresivamente a lo largo de la cadena trófica, llegando a causar daños crónicos, especialmente en los eslabones superiores, entre los cuales se encuentra el hombre.

METALES PESADOS

Los metales pesados son agentes contaminantes de ecosistemas acuáticos, y como tales, alteran la estructura de los mismos, provocando cambios en las comunidades bióticas (Kulshrestha *et al.*, 1989). Los metales pesados son de los contaminantes más comunes en este tipo de ecosistemas; se les considera peligrosos para la vida acuática por su prolongada permanencia en los sedimentos, su tendencia a bioacumularse en los tejidos o células vivas, y porque son vertidos al medio a través de numerosas y diversas fuentes antropogénicas. Los ciclos biogeoquímicos de los metales han sido profundamente modificados por la actividad humana; existe una estrecha relación entre los diferentes ciclos de éstos y los procesos biológicos. Metales pesados, potencialmente peligrosos, aparecen en condiciones naturales en cantidades traza ($<1\ \mu\text{mol l}^{-1}$) en el agua. Las actividades antropogénicas con frecuencia incrementan las concentraciones de estos

metales, lo que constituye una fuerte alteración de los ecosistemas, que puede llegar a afectar a la salud pública.

Los metales pesados, tal y como los define Viarengo (1989), son un grupo de elementos con un peso atómico entre 63.54 y 200.59, y se caracterizan por tener una distribución electrónica similar en el último nivel electrónico (por ejemplo, Cu^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} y Hg^{+2}); esto excluye a los alcalinotérreos, alcalinos, lantánidos y actínidos (Abel, 1989). Aunque estos elementos son tóxicos por encima de un determinado umbral, la mayoría de ellos son esenciales para el metabolismo de los seres vivos a bajas concentraciones (Rainbow, 1985). Los elementos traza necesarios para los procesos vitales incluyen: cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, vanadio, estroncio y zinc, si bien éstos no son los únicos (Kennish, 1992). Sin embargo, algunos de estos elementos pueden ser tóxicos para los organismos cuando aparecen a elevadas concentraciones (Eichenberger, 1986; Furness & Rainbow, 1990; Merian, 1991; Kennish, 1992); la presencia de elevadas concentraciones de los metales indispensables puede ejercer un efecto tóxico sobre los organismos, llegando a inhibir el crecimiento. Los metales pesados más frecuentes como contaminantes son: cadmio, cromo, mercurio, plomo, zinc, cobre, selenio, arsénio y antimonio. Algunos metales pesados no presentan una función biológica conocida, por lo que son más efectivos, desde un punto de vista toxicológico, a concentraciones menores (Furness & Rainbow, 1990).

Una importante fracción de los metales pesados que aparecen en los estuarios y zonas costeras provienen de los desechos domésticos, industriales y de origen agrícola. Cantidades sustanciales de cobre, plomo y zinc provienen de las cañerías y tanques, por ejemplo, de los sistemas domésticos. Además, las fuentes industriales, como son la minería, las industrias de recubrimientos metálicos, la manufactura de objetos metálicos, colorantes, pinturas y la industria textil, aumentan la cantidad de los metales pesados en los ecosistemas costeros. Este incremento puede tener dos consecuencias: eliminar la disponibilidad de metales esenciales o elevar la concentración a niveles tóxicos (Eichenberger, 1986).

Los microorganismos son, generalmente, los primeros en ser afectados por las descargas de metales pesados en el ambiente o ecosistema (Hughes & Poole, 1989; Wood, 1989), ya que están directamente en contacto con el medio, separados

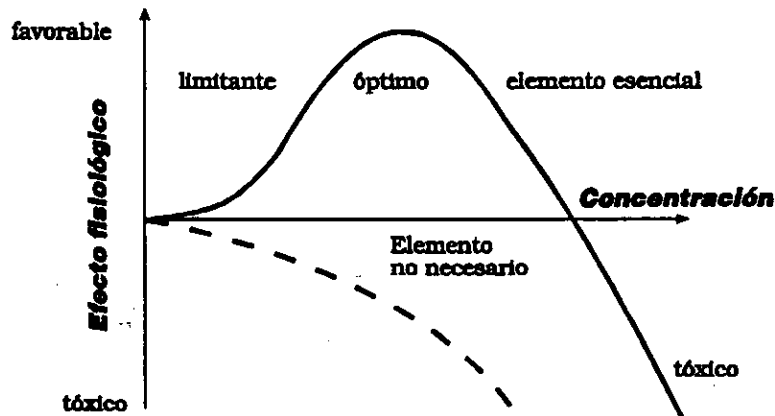


Figura 1.- Relación entre la concentración de un elemento y su efecto fisiológico. El rango de concentración del elemento depende de la especie de organismo estudiado y de la presencia de otros iones metálicos. (Figura tomada de Morgan & Stumm, 1991).

únicamente por una membrana y/o una pared celular. Los contaminantes ejercen directamente su efecto sobre ellos, alterando a su vez la comunidad a la que pertenecen: las formas sensibles mueren y las resistentes se multiplican, cambiando el equilibrio entre las especies, o bien alterando las características metabólicas de la comunidad (Sterrit & Lester, 1980). Los sistemas de autodepuración de las aguas con frecuencia se encuentran seriamente dañados a causa de este hecho. Por otro lado, algunas sustancias tóxicas pueden ser modificadas o degradadas por microorganismos resistentes, produciendo sustancias todavía más tóxicas.

Las respuestas de los organismos a los efectos tóxicos de los metales pesados se manifiestan a numerosos niveles. Algunos de los metales pesados ejercen su toxicidad a nivel enzimático uniéndose a los grupos sulfidrilo formando mercáptidas (inhibiendo el enzima), o bien modificando su estructura proteica. En general, los cambios se producen en la fisiología, reproducción y desarrollo de los organismos. La inhibición del crecimiento a causa de la exposición al contaminante es la respuesta más común en crustáceos (Leland & Kuwabara, 1984), moluscos, como el mejillón (Redpath, 1985), equinodermos (Fujisawa & Amemiya, 1982), hidroideos (Stebbing, 1976), protozoos (Irato & Piccini, 1987) y algas, tanto macroscópicas como microscópicas (Rai *et al.*, 1981). Otra alteración fisiológica frecuentemente citada se produce en el consumo de oxígeno (MacInnes &

Thurberg, 1973; Thurberg *et al.*, 1973). También se ven involucrados el comportamiento alimentario de organismos superiores, el metabolismo respiratorio y la eficiencia digestiva. Sin embargo, a concentraciones pequeñas los metales pesados pueden activar el crecimiento, el consumo de oxígeno y otros procesos fisiológicos, y a esta situación se la denomina hormesis (Stebbing, 1981).

La figura 1 ilustra, de una manera simple, la dependencia fisiológica (crecimiento o producción de biomasa) de la concentración de un metal esencial. El rango de concentración más bajo limita el crecimiento; en el siguiente rango de concentración se obtiene un crecimiento óptimo; a concentraciones mayores se observan efectos tóxicos (reducción del crecimiento). Como también muestra la figura, los elementos no esenciales (como el cadmio y el plomo) producen un efecto fisiológico negativo al aumentar su concentración.

Los metales más tóxicos se unen preferentemente a ligandos de azufre y de nitrógeno, convirtiéndose frecuentemente en uniones irreversibles con átomos de azufre y nitrógeno en sitios específicos de macromoléculas dentro de los sistemas biológicos (Nieboer & Richardson, 1980). Los metales que se unen preferentemente al oxígeno son generalmente mucho menos tóxicos, y este grupo incluye a los metales ligeros (Atchison *et al.*, 1987).

Numerosos autores han ordenado los metales pesados según su grado de toxicidad; sin embargo, estas clasificaciones están sujetas a cambios dependiendo de las condiciones físico-químicas del medio, las cuales afectan a la especiación del metal. Además, la bioquímica del organismo a estudiar juega un papel fundamental en su susceptibilidad frente a la toxicidad del metal, siendo el umbral de toxicidad muy diferente para los diferentes organismos. Los organismos presentan mecanismos de defensa frente a niveles tóxicos de metales; tras ser asimilados, los metales pesados pueden ser secuestrados por metalotioneinas, fitoquelatinas o proteínas similares y también por los lisosomas, lo que provoca una detoxificación celular (Viarengo *et al.*, 1985).

El comportamiento químico de cualquier elemento en el ambiente depende de la naturaleza de los compuestos y de sus especies químicas. Los efectos fisiológicos, ecológicos y toxicológicos de un metal dependen en buena medida

de su estructura específica. Así, por ejemplo, el efecto del cobre sobre el crecimiento de las algas depende de que el Cu(II) esté presente como ion Cu^{2+} libre, como carbonato o como un complejo orgánico. Este hecho se ha observado en estudios sobre la relación existente entre la actividad del ion Cu^{2+} y la toxicidad del cobre sobre el fitoplancton: la actividad del ion cúprico se altera independientemente de la concentración total de Cu(II); variando la concentración de elementos formadores de complejos y el pH (por ejemplo usando diferentes tampones para el cobre) varía también el grado de toxicidad, si bien la concentración total de cobre es la misma, pero su forma química no (Sunda & Guillard, 1976; Merian, 1991).

La forma química en que aparecen los compuestos tóxicos determina su grado de toxicidad; así el mercurio metálico y los iones de mercurio tienen un efecto tóxico menor que los compuestos orgánicos de mercurio. Los compuestos orgánicos de plomo son particularmente tóxicos, incluyendo el tetraetil-plomo que se adiciona frecuentemente a la gasolina y que se transforma en el aire en trietil-plomo. Los compuestos hidrosolubles de plomo penetran rápidamente en las células, causando cambios estructurales en las mismas. El arsénico, por su parte, parece inhibir el crecimiento a concentraciones superiores a 1 mg l^{-1} (Reinheimer, 1991).

Generalmente se asume que los iones metálicos libres son las formas más tóxicas de los metales. Los iones metálicos pueden unirse a ciertos ligandos para formar complejos relativamente insolubles que precipitan y van a los sedimentos, siendo así menos disponibles para los organismos que los iones libres o los complejos solubles. Los factores físicos y químicos (orgánicos e inorgánicos) pueden influir significativamente sobre la disponibilidad y toxicidad de los metales pesados en los ambientes acuáticos y terrestres (Gadd & Griffiths, 1978; Babich & Stotzky, 1978, 1980; Tyler, 1981). Un descenso del pH del medio aumenta la disponibilidad, mientras que a pH más o menos neutro se pueden formar hidróxidos y carbonatos insolubles (Atchison *et al.*, 1987). Determinados minerales pueden adsorber metales pesados reduciendo su toxicidad (Babich & Stotzky, 1977a, b), y los compuestos orgánicos (ácidos húmicos, proteínas, aminoácidos, polisacáridos y agentes quelantes) pueden actuar de una manera similar tanto en el agua como en sistemas terrestres (Babich & Stotzky, 1980; Tyler, 1981). También

los aniones y cationes pueden reducir la toxicidad: cationes divalentes como el Ca^{+2} (Abel & Bärlocher, 1984) quizás por su competición en los sistemas de entrada, y algunos aniones debido a la formación de complejos, o por la formación de compuestos insolubles, como sulfuros, carbonatos y fosfatos (Gadd & Griffiths, 1978; Babich & Stotzky, 1980).

Interacciones similares pueden ocurrir en los medios de cultivo de laboratorio con aniones y cationes, dónde sustancias o agentes complejantes como el EDTA o el ácido cítrico pueden ligar cantidades importantes de metales. En la mayoría de los casos la toxicidad se ve reducida. Sin embargo, no siempre que se producen interacciones se produce una reducción de la toxicidad. Algunos complejos metálicos son más tóxicos que los iones libres (Gadd & Griffiths, 1978), además las mezclas de iones metálicos pueden producir efectos sinérgicos o antagónicos (Babich & Stotzky, 1983).

En términos de contaminación ambiental los metales pesados pueden clasificarse en (Wood, 1974):

- a) no críticos,
- b) tóxicos, pero poco o raramente solubles, y
- c) muy tóxicos y relativamente accesibles.

Según esta clasificación la mayoría de los metales más comunes que aparecen en los estuarios (por ejemplo, cobre, zinc, plomo y níquel) son altamente tóxicos y accesibles como posibles contaminantes.

Los sedimentos de las zonas de estuario constituyen un importante reservorio de metales pesados. El flujo de estos metales en estas zonas depende de un importante número de procesos que incluyen reacciones de adsorción, desorción, floculación y sedimentación. Los metales pesados alcanzan el hábitat estuarino a través de una amplia gama de actividades humanas: consumo de combustibles fósiles, pinturas anti-incrustantes, productos de alto poder de corrosión (cobre, cromo y zinc), eliminación de lodos activos de tratamientos de aguas residuales, eliminación de cenizas, emisiones de automóviles (plomo), efluentes de refinerías de petróleo y otros procesos industriales.

Las microalgas marinas son afectadas por los vertidos de metales pesados al medio marino. Este hecho cobra especial importancia si tenemos en cuenta su papel como primer eslabón de la cadena trófica marina. Por otra parte, las microalgas son buenos indicadores de los niveles de contaminación en el medio marino (Hörnström, 1990).

INCORPORACIÓN DE LOS METALES PESADOS A NIVEL CELULAR

Se han propuesto mecanismos activos y pasivos para la incorporación de metales pesados por las diferentes especies de algas. Existen cuatro mecanismos generales de entrada de metales a la célula, los cuales están mediados por moléculas transportadoras:

- 1) Transporte vía transportadores que son específicos para un metal dado o que lo transportan porque es químicamente similar a los cationes nutricionalmente esenciales (ej.: calcio, molibdeno y zinc).
- 2) Formación de complejos no específicos de formas metálicas con moléculas transportadoras. En este mecanismo y en el anterior las reacciones del metal podrían estar ligadas a la formación de complejos con moléculas transportadoras. Las formas metálicas con la energía libre más alta (los iones libres) podrían reaccionar más fácilmente con el transportador y ser más disponibles para la incorporación (Sunda & Guillard, 1976).
- 3) Transporte de metales formando complejos con nutrientes orgánicos esenciales (ej.: aminoácidos o proteínas).
- 4) Transporte de metales, nutricionalmente esenciales, como complejos. Este mecanismo es raro, dada la baja disponibilidad de los metales formando complejos con compuestos orgánicos sintéticos (EDTA, NTA, etc.) (Sunda & Guillard, 1976; Anderson & Morel, 1982).

El proceso mediado por transportador no es la única forma de incorporación del metal. Las formas metálicas solubles en lípidos o de polaridad reducida, podrían atravesar las membranas sin transportador o por transporte pasivo. Su reducida polaridad es la explicación más probable para la excepcionalmente alta biodisponibilidad del metil-mercurio (Phillips & Buhler, 1978). Gadd & Griffiths (1978) destacan que las cantidades de metales pesados que se incorporan a través

de mecanismos pasivos y que se ligan a la superficie de las células son muy bajas en relación a las cantidades que se incorporan mediante procesos metabólicos o dependientes de energía. Las paredes de las células algales tienen una gran capacidad para ligar metales. La diatomea *Phaeodactylum* se ha calculado que posee 6.7×10^8 lugares para ligar átomos de plomo por célula (Peterson *et al.*, 1975).

Todos los metales pesados son tóxicos para las microalgas a altas concentraciones, aunque el grado de toxicidad difiere en los distintos metales pesados según pertenezcan al grupo de esenciales (cobre, molibdeno, zinc, etc.) o al de los no esenciales (cadmio, plomo, mercurio, etc.). En ausencia de metales pesados esenciales, las algas disminuyen la eficiencia en el crecimiento y se ven afectados uno o más procesos fisiológicos y/o bioquímicos, o es inhibida alguna parte importante de su ciclo de vida o de su metabolismo.

Aunque la pared celular puede adsorber metales de forma pasiva, la integridad de la membrana plasmática puede ser destruida por un exceso de metal (Tarchevskii *et al.*, 1982). Desde el punto de vista estructural, la acción de los metales traza se traduce en la aparición de alteraciones morfológicas (Thomas *et al.*, 1980). Este fenómeno ha sido observado en las Chlorophyta (Rosko & Rachlin, 1977), las Chrysophyta (Davies, 1974) y en las Bacillariophyta (Nuzzi, 1972; Berland *et al.*, 1977; Morel *et al.*, 1978; Stauber & Florence, 1987, 1990).

COBRE: PROPIEDADES Y APLICACIONES

El metal pesado elegido para el presente estudio es el cobre; su elección se ha basado en que es uno de los metales pesados más abundantes en los efluentes, tanto urbanos como industriales, que contaminan las aguas. Además, se utiliza habitualmente como algicida, a pesar de ser un metal esencial para el normal desarrollo de las microalgas. Se describen brevemente a continuación algunas de las propiedades y aplicaciones del cobre.

El cobre es un metal rojizo, dúctil y maleable, ampliamente distribuido, con un peso atómico de 63.57, número atómico 29, y un peso específico de 8.96, siendo sus puntos de fusión y ebullición de 1083° C y 2595° C, respectivamente.

El Cu (II) es la forma química más importante del cobre. La mayoría del Cu (I) es rápidamente oxidado a compuestos cúpricos. Interacciona con otros metales, como son el hierro, el molibdeno y el zinc (Scheinberg, 1991). Virtualmente todos los complejos y compuestos de Cu(II) son azules o verdes. Forma complejos fácilmente y está relacionado o forma parte de la mayoría de los procesos metabólicos de los seres vivos, fundamentalmente debido a su potencial redox Cu(I)/Cu(II).

El cobre es muy utilizado en los sistemas eléctricos, en cañerías de agua, materiales de tejados y cocinas; en equipamiento químico y farmacéutico; como pigmento o colorante; en la precipitación de selenio (Scheinberg, 1991). Se han utilizado soluciones de cobre en varios procesos industriales, como la galvanoplastia, producción textil, y como catalizadores en varios procesos químicos. En la agricultura a menudo se utilizan compuestos que contienen sulfato de cobre. También se ha utilizado como contraceptivo intrauterino (Zipper *et al.*, 1968, citado en Scheinberg, 1991), pero una vez descubiertas sus reacciones tóxicas ha caído en desuso. Permite la formación de aleaciones con zinc (latón), con estaño (bronce), con níquel, aluminio, oro, plomo, cadmio, cromo, berilio, silicio o fósforo.

El sulfato de cobre se utiliza para aportar a los pastos el cobre necesario para un buen rendimiento; también se utiliza como algicida y molusquicida en el agua; con extracto de lima, como fungicida para las plantas; como un mordiente; en industrias de electrolaminado; como componente de la solución de Fehling para estimar los azúcares reducidos en orina. El óxido cúprico se ha utilizado en pintura para los cascos de los barcos, y se propuso como estimulador del crecimiento de cerdos y pollos. Los cromatos de cobre se utilizan como pigmentos, como catalizadores de la hidrogenación en fase líquida, y como fungicidas de las patatas. La pintura denominada verdigris es oxiacetato cúprico. Una solución de hidróxido de cobre en un exceso de amonio forma un solvente de la celulosa que se utiliza en la producción del rayón (Scheinberg, 1991). En las células solares fotovoltaicas también se utilizan importantes cantidades de cobre.

Dado que el cobre y sus derivados presentan propiedades catalíticas en numerosas reacciones químicas, también activan la formación de dioxinas cloradas y dibenzofuranos durante la incineración (Stieglitz *et al.*, 1988).

Todas estas aplicaciones del cobre, y otras que no se especifican, hacen de él uno de los elementos más abundantes en los efluentes de origen industrial, agrícola y urbano (Merian, 1991).

Distribución del cobre en la Naturaleza

Superficie terrestre.- El cobre está muy distribuido en la Naturaleza en estado elemental, en sulfuros, cloruros, arseniuros y carbonatos. Es oxidado en el aire, dando algunas veces una capa verde de hidroxisulfato e hidroxicarbonato. La concentración de cobre en la corteza continental es generalmente de 50 ppm, con tendencia a ser más alta en los minerales de ferromagnesio, como basalto y biotita, donde el promedio es de 140 ppm. La arenisca contiene 10-40 ppm de cobre y la arcilla 30-150 ppm. El carbón es relativamente bajo en cobre (Margalef, 1974).

Océanos.- En los ciclos sedimentarios, el cobre está concentrado en la fracción mineral arcillosa con un ligero enriquecimiento en aquellas arcillas ricas en carbono orgánico. Más del 99% del cobre que llega al océano precipita, en su gran mayoría con arcillas y, parcialmente, con óxido de manganeso. Los lodos marinos contienen entre 20 y 30 ppm de cobre, mientras que en el agua de mar su concentración es de aproximadamente 0.3 mg l⁻¹ (Margalef, 1974; Merian, 1991).

Fuentes de emisión.- La mayor fuente de contaminación del cobre al aire son los procesos metalúrgicos. Pueden también producirse altas concentraciones de óxido de cobre en operaciones de soldadura sobre material de latón o sobre material pintado con pinturas que contienen cobre. En cuanto a los aportes de origen humano al medio marino, éstos son relativamente débiles en comparación con los aportes naturales originados por el drenaje de los continentes. Así, diversas industrias situadas en las zonas costeras, como las automovilísticas o lodos de los dragados de los puertos, constituyen las principales fuentes.

Riesgos de la utilización del cobre

En los animales, la concentración de cobre está regulada por homeostasis; por tanto, ni su deficiencia ni su toxicidad es, en general, frecuente. El cobre es un cofactor esencial en varios enzimas, catalizando varias reacciones de oxidoreducción. Su deficiencia causa anemia, debilidad de los huesos y del tejido conectivo, y pérdida de la pigmentación del pelo (Fergusson, 1990). Es posible que una alta absorción de zinc pueda inducir una deficiencia del cobre.

La ingesta diaria de una persona en condiciones normales contiene entre 2 y 5 mg de cobre. La concentración de cobre en sangre es de 1 mg l^{-1} , y aproximadamente la mitad de la ingesta de cobre se libera en las heces (Fergusson, 1990; Merian, 1991). En mamíferos, un exceso de ingestión de cobre irrita los nervios del estómago y provoca náuseas. Un exceso crónico reduce el crecimiento, produce hemólisis, baja la concentración de hemoglobina y daña tejidos como hígado, riñón y cerebro (Sarkar, 1988; Fergusson, 1990).

Las proteínas ceruloplásmicas (que transportan el 95% del cobre en sangre) son deficientes en la mayoría de los pacientes con la enfermedad de Wilson, que es debida a un error metabólico congénito. Pacientes que padecen esta enfermedad presentan niveles elevados de cobre en el hígado, con disfunciones en éste (Fergusson, 1990).

Las propiedades elementales del cobre son tales que éste no puede existir en cantidades apreciables en el organismo en forma iónica libre. Sólo en el estómago el alto grado de acidez permite la presencia de cobre en esta forma iónica. En el resto del cuerpo el cobre forma complejos con proteínas, péptidos y aminoácidos y con otras sustancias orgánicas. Hay unas pocas proteínas de las que el cobre forma parte integral; éstas son las llamadas metaloproteínas, muchas de las cuales son enzimas y el cobre es parte de su centro activo (Kojima, 1988).

En las plantas es menos frecuente la toxicidad del cobre que su deficiencia, en contraste a lo que sucede con los animales, en los que la toxicidad puede verse inducida por un exceso en el ambiente, o bien por anomalías genéticas en los individuos aunque las condiciones ambientales sean las normales (Fergusson,

1990; Merian, 1991). En la cadena trófica, plantas e invertebrados tolerantes pueden acumular cobre, lo que se traduce en un posible riesgo para los grandes animales que los consumen. Las plantas contienen por término medio entre 4 y 20 mg de cobre por kg de peso seco, mientras que en las algas marinas este contenido oscila entre 2 y 68 mg. Se ha observado que en un ecosistema comparable, las plantas acuáticas toman unas 3 veces más cobre que las terrestres (Merian, 1991).

TOXICIDAD DEL COBRE EN LAS MICROALGAS

Existe abundante bibliografía acerca de los efectos tóxicos del cobre iónico sobre las algas. En el caso de las microalgas, el cobre restringe la captación y asimilación de nitratos y silicatos, además de inhibir la fotosíntesis, crecimiento (por tanto la división celular) y las síntesis de aminoácidos.

Cantidades traza de cobre son esenciales para los procesos metabólicos de las algas (O'Kelley, 1974; Sorentino, 1979). Concentraciones altas de cobre son tóxicas, y durante muchos años el sulfato de cobre se ha utilizado ampliamente como algicida para controlar o prevenir crecimientos indeseables de algas.

La inhibición del crecimiento se ha observado a niveles muy bajos de cobre: 0.016 mg l⁻¹ en *Nitzschia closterium* (Rachlin *et al.*, 1983b), 0.2 mg l⁻¹ en *Chlorella vulgaris* (Baylock *et al.*, 1985), 0.4 mg l⁻¹ en *Selenastrum capricornutum* (Baylock *et al.*, 1985), 0.55 mg l⁻¹ en *Chlorella saccharophila* (Rachlin *et al.*, 1982a) y 0.6 mg l⁻¹ en *Scenedesmus* (Sandmann & Boger, 1980a). *Navicula incerta* es una excepción, mostrando un 50% de inhibición del crecimiento a una concentración relativamente alta de cobre (10.5 mg l⁻¹) (Rachlin *et al.*, 1983a). Aparte de las grandes diferencias entre las distintas especies microalgales respecto a la toxicidad por cobre, generalmente se citan las cianobacterias y las diatomeas como las más sensibles a esta toxicidad.

El mecanismo de toxicidad del cobre iónico se conoce de un modo indirecto. Se ha propuesto que la unión inicial entre el cobre y la célula puede ser a través de restos carboxilo y amino de la membrana, más que con grupos tiol, porque la constante de estabilidad cobre-alga es de un orden de magnitud menor que la

constante para la unión tiol-cobre (Florence *et al.*, 1983; Gavis, 1983). En la membrana celular, el cobre puede afectar a la permeabilidad celular o interferir con la unión de metales esenciales (Sunda & Huntsman, 1983). Después tiene lugar el transporte del cobre hacia el citoplasma; allí el cobre puede reaccionar con los grupos -SH de los enzimas y de tioles libres (ej. glutatión), alterando el sitio activo de los enzimas y la división celular (Stauber & Florence, 1985a, b; Florence & Stauber, 1986). El cobre puede también ejercer su toxicidad sobre orgánulos subcelulares, interfiriendo en el transporte electrónico mitocondrial, la respiración (Cedeno-Maldonado & Swader, 1974), producción de ATP (Viarengo *et al.*, 1981) y la fotosíntesis en el cloroplasto (Overnell, 1975).

La inhibición de la fotosíntesis por el cobre se ha observado en algunas diatomeas (Erickson, 1972; Overnell, 1975). La inhibición de la división celular sin efecto sobre la fotosíntesis raramente se ha observado. Fisher y Jones (1981) muestran que, en *Asterionella japonica*, las células tratadas con cobre fotosintetizan normalmente, aumentando de tamaño cuando fijan carbono, que no puede ser excretado o utilizado en la división celular. Davies (1976) también encuentra que el crecimiento está desacoplado de la división celular en *Dunaliella tertiolecta* e *Isochrysis galbana* tratadas con mercurio. Parece que metales como el cobre y el mercurio pueden, en algunos casos, inhibir el proceso de la división celular independientemente de cualquier otro efecto sobre la producción de nuevo material celular (Stauber & Florence, 1987).

Los efectos del cobre a nivel ultraestructural en las diatomeas han sido revisados por Smith (1983); *Ditylum brightwellii* expuesta a 0.3 mg l⁻¹ de cobre, presenta un aumento celular, con el protoplasto alejado de la pared celular y los cloroplastos concentrados en un grupo (Cantenford, 1980). Análisis morfométricos de la cianobacteria *Plectonema boryanum* expuesta a cobre revelan los siguientes cambios (Rachlin *et al.*, 1982b): incremento en el volumen celular, descenso del área superficial en los tilacoides, marcado descenso en el volumen de las inclusiones lipídicas y aparición de cuerpos granulares electrondensos.

Varias respuestas citológicas indican la sensibilidad de las membranas fotosintéticas y mitocondriales al cobre, y se recogen en los estudios de Rachlin *et al.* (1982b), dónde el cobre es el único entre 8 metales pesados ensayados que

causa una marcada reducción en el contenido celular en lípidos. Estos estudios confirman las experiencias de Sandmann & Boger (1980a), dónde el cobre induce daños de membrana en *Scenedesmus acutus*, y apoya su modelo de reacciones de peroxidación en lípidos inducidas por cobre (Sandmann & Boger, 1980b) .

Diatoma tenue var. *elongatum* incorpora cobre en los cuerpos polifosfatados (Sicko-Goad & Stoermer, 1979). En la diatomea *Amphora veneta* se observan cuerpos polifosfatados que contienen, además de fósforo, calcio y cobre dentro de las vacuolas, pero además se encontraron "cuerpos cúpricos" asociados a membranas, que contienen azufre, calcio y cobre (Daniel & Chamberlain, 1981). Silverberg *et al.* (1976) encuentran que cepas tolerantes de *Scenedesmus* presentan importantes cantidades de cobre en el núcleo a concentraciones que son letales para cepas no tolerantes.

CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo (CMF) es una técnica diseñada para la valoración de una o más propiedades de células individuales en suspensión, de forma secuencial en el tiempo. Los aparatos diseñados para estas mediciones provocan el paso consecutivo de células individuales suspendidas en un fluido apropiado a través de una zona delimitada de análisis, donde se lleva a cabo éste a medida que la célula atraviesa dicha zona. Los resultados del análisis se presentan normalmente en forma de histograma de distribución de la población celular con respecto a los parámetros analizados (Shapiro, 1990).

Citometría de flujo es un término general que hace referencia a una medida rápida de partículas que se mueven en un flujo. La información se obtiene a través del uso de varias propiedades ópticas de las partículas, de un rango de tamaño entre 1 y 150 μm . Durante las décadas de los 60, 70 y 80 se desarrollaron gran variedad de este tipo de medidas (Yentsch & Pomponi, 1986). Los sistemas básicos de CMF son, por una parte, los que determinan el volumen de las células en suspensión por medición de pulsos de resistividad (ej. Coulter Counter) y, por otra, los que llevan a cabo un análisis óptico (dispersión de la luz, absorción, fluorescencia, polarización, etc.) de las células; en éstos, y en instrumentos posteriores, las partículas que van en el flujo son iluminadas por una intensa

fuente de luz. La fluorescencia y/o la luz dispersada 90° son detectadas por fotomultiplicadores (PMTs), mientras que la luz dispersada en el ángulo anterior ("forward angle light scatter", FALS), que es función del tamaño celular, es detectada por un fotodiodo. El uso de láseres permite la selección de una longitud de onda específica a elevadas intensidades, lo que maximiza la emisión fluorescente.

La epifluorescencia o citometría de flujo basada en láser, la autofluorescencia de los pigmentos, la fluorescencia inducida por tinciones y la luz dispersada son utilizadas como sondas para cuantificar subpoblaciones en cultivos de microalgas y en poblaciones naturales de fitoplancton. Esta técnica, cuando se combina con tinciones bioquímicas selectivas y tecnología de inmunofluorescencia, hace posible la medida simultánea de múltiples parámetros (ej., clorofila, proteína, ADN, etc., además de la luz dispersada 90°) sobre células o partículas individuales. Las medidas se hacen a tasas superiores a 1000 células por segundo. La posibilidad de procesar gran número de partículas permite un análisis estadístico riguroso, incluso para muestras naturales heterogéneas.

La CMF por activación mediante láser se ha convertido en un importante útil experimental en varias áreas de la fisiología celular, principalmente animal, y en microbiología. Importantes avances de esta técnica son la capacidad de una rápida identificación, cuantificación y resolución de subpoblaciones discretas en muestras de células heterogéneas sobre las bases de la expresión de marcadores de la superficie celular o capacidades metabólicas internas (Dive *et al.*, 1987; Papa *et al.*, 1987; Marti *et al.*, 1988; Toppari *et al.*, 1988; Xu *et al.*, 1990).

La CMF es una técnica que presenta indudables ventajas, como son:

- rapidez de análisis (entre 5000 y 10000 células por segundo),
- capacidad de medidas multiparamétricas,
- gran tamaño de la población analizada,

aunque también presenta inconvenientes, tales como:

- requerimiento de equipos especiales,
- necesidad de tener células en suspensión.

La medida simultánea de múltiples parámetros de células individuales proporciona información sobre la correlación entre ellos. Dos sistemas de pigmentos naturales, o dos tinciones, pueden ser excitados por un láser único, y cada emisión puede ser medida por un fotomultiplicador diferente. Un segundo láser permite medidas adicionales y una mayor flexibilidad.

La CMF requiere un cuidadoso manejo y/o preparación de las células y/o partículas, una instrumentación sofisticada y un extenso análisis de datos. El análisis de células individuales permite medidas rápidas, seguras (datos cuantitativos a partir de relativos, ya que los ejes de datos pueden ser calibrados por métodos tradicionales), y prácticamente continuas.

La CMF se ha utilizado durante varias décadas en las ciencias biomédicas como una técnica de rutina, complementaria y sustitoria del análisis celular microscópico y del recuento (Balfourt *et al.*, 1992). En los últimos años se han publicado bastantes artículos en los que la CMF juega un papel más importante y en las que se describen nuevas aplicaciones de esta técnica (Phinney & Cucci, 1989; Legendre & Yentsch, 1989). Los citómetros de flujo se utilizan frecuentemente para la identificación y recuento de microorganismos acuáticos. En el caso del fitoplancton, las células pigmentadas pueden ser detectadas e identificadas por su autofluorescencia y las propiedades que presenta su luz refractada (Balfourt *et al.*, 1992). Otra aplicación importante de la CMF es el estudio de fenómenos fisiológicos y morfológicos que se expresen en propiedades ópticas de las células, tanto de forma natural como con ayuda de colorantes específicos.

Recientemente, ha habido una revolución dentro de las sondas de fluorescencia. Además de los cromóforos naturales (clorofila a, b y c, ficoeritrina, ficocianina, fucoxantina, piridinas, luciferina, flavinas, NADP y NADPH), una amplia gama de tinciones, la mayoría de ellas vitales, se han convertido en instrumentos habituales. Las sondas inmunofluorescentes, así como los anticuerpos monoclonales más específicos y la citoenzimología de flujo, han empezado a utilizarse (Yentsch & Pomponi, 1986).

Aunque la fluorescencia de los pigmentos celulares y las señales producidas por la luz refractada por las células de plantas superiores y algas pueden ser

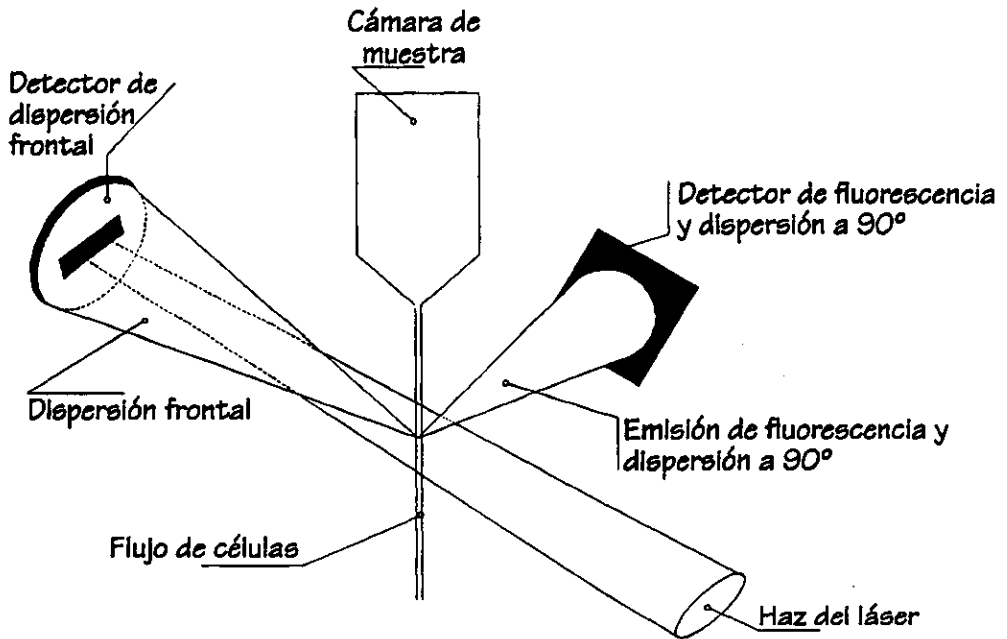


Figura 2.- Esquema de la cámara de análisis de un citómetro de flujo. El flujo de las células, que sale expulsado de la cámara de muestra, interacciona con el haz de láser produciéndose una dispersión de luz de láser que se recoge frontalmente con un detector de dispersión entre 1 y 20° respecto al haz de láser. La emisión de fluorescencia y la luz de láser dispersada 90° se recogen con una lente situada perpendicularmente al flujo de células y al haz de láser.

detectadas fácilmente por esta sofisticada técnica, son escasos los trabajos que traten de las aplicaciones de la CMF a la biología vegetal y a la biología marina.

Estructura de la cámara de análisis de un citómetro de flujo

En un citofluorómetro de flujo el análisis se lleva a cabo haciendo pasar un flujo de células en suspensión por el punto de enfoque de un haz de láser. La interacción de las células con el láser provoca, por un lado, la dispersión de parte de la luz del haz, que se recoge por lentes situadas frontal y perpendicularmente respecto al haz (Fig. 2) y por otra, la emisión de fluorescencia debido a la excitación por el láser de fluorocromos naturales o incorporados a la célula. Dicha emisión se recoge por la lente situada perpendicularmente al haz de láser (Fig. 2). A partir

de la intensidad de luz recogida por las lentes, se obtiene mediante fotomultiplicadores una señal de voltaje, la cual es amplificada a pulsos de salida individuales para cada célula y proporcionales al valor del parámetro biológico que se está determinando.

Para que las mediciones de las diferentes células dependan exclusivamente del valor de dichos parámetros, es necesaria una iluminación homogénea respecto a la intensidad del haz del láser de todas las células analizadas. La optimización de esta homogenización de iluminación se consigue mediante un enfoque del flujo de líquido dónde viajan las células respecto al haz de láser y mediante la formación de un haz de láser de sección elíptica.

El paso de células individuales y centradas en el punto de enfoque del láser se consigue utilizando el flujo laminar. Tal como se muestra en la figura 3, la corriente de líquido, en el cual se desplazan las células, está formada por dos flujos concéntricos: uno interno (normalmente medio de cultivo o cualquier tampón que preserve las características celulares a estudiar) dónde se encuentran las células, y un flujo externo compuesto de una disolución salina fisiológica. Al disminuir la presión del flujo interno respecto al externo, se produce la centralización del flujo interno en medio del cilindro de líquido, que proviene de la cámara de muestra, de forma que las células se ven forzadas a circular por un cilindro interno de flujo laminar (no se mezclan los dos flujos) de dimensiones ajustadas a su tamaño. Ello provoca el paso de células, una a una, y centradas en el eje del cilindro de líquido, de forma que todas pasarán por el punto medio del haz de láser. El diámetro utilizado para el flujo externo es de unos 50 a 100 μm .

Para paliar las posibles desviaciones de la corriente de líquido en el que viajan las células respecto al punto medio del haz de láser, lo cual provocaría la iluminación de algunas células con intensidades menores de la máxima, el sistema óptico de enfoque del láser produce la formación de un haz de sección elíptica con unas medidas de 750 μm de eje mayor, perpendicular al flujo de células, y de 16.5 μm de eje menor, paralelo al flujo celular. Se produce una distribución gaussiana de energía en dos haces de láser de sección elíptica con diferentes longitudes del eje mayor, y las pequeñas variaciones que pueda sufrir

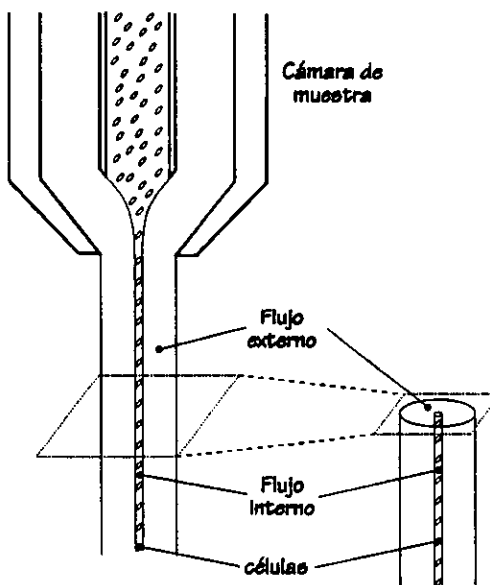


Figura 3.- Flujo laminar de salida de la muestra, creado por la diferencia de presiones entre el fluido de la muestra (fluido interno) y el fluido acompañante (fluido externo).

el flujo respecto a su posición en el centro del haz provocarán unas variaciones de intensidad de iluminación mucho mayores en el haz de eje mayor más pequeño que en aquel de eje mayor más largo. En el caso del haz utilizado en este sistema, un corrimiento de $58 \mu\text{m}$ del flujo laminar (aproximadamente un diámetro del flujo) respecto al punto medio del láser, sólo supone un 1% de variación en la intensidad de iluminación; en un haz de $131 \mu\text{m}$ de eje mayor, el desplazamiento de sólo $14 \mu\text{m}$ (poco más del diámetro de varios tipos celulares) provocará la misma variación del 1%.

Tipos de parámetros celulares medibles en un citómetro de flujo

Los tipos de parámetros celulares que se pueden determinar por esta técnica pueden agruparse en función del tipo de luz detectada, tal como se resume en la Tabla I.

Tabla I.- Algunos de los parámetros y fluorocromos que se pueden determinar y utilizar en citofluorometría de flujo (modificada de Carretero, 1985).

TIPO DE LUZ	MEDICION	PARAMETRO
Láser incidente	dispersión frontal	tamaño celular, estructura externa
	dispersión 90°	granularidad celular (vesiculación)
FLUOROCROMOS		
Fluorescencia	Bromuro de etidio	cantidad de ADN
	Ioduro de propidio	
	Naranja de acridina	
	Mitramicina Hoechst 33258	
	Naranja de acridina	cantidad de ARN
	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	cantidad de proteínas
	Isotiocianato de tetrametilrodamina (TRIC)	
	Diacetato de fluoresceína (FDA)	esterasas
	Dibutirato de fluoresceína	
	Flavona-3-difosfato triamónico	fosfatasa ácida
7-Br-3-hidroxi-2-nafto- α -anisidina-fosfato	fosfatasa alcalina	
Lisil-alanil-4-metoxi-2-naftilamida	proteasas	
γ -glutamil-4-metoxi-2-naftilamida		
Anticuerpos marcados con FITC	antígenos de membrana	
Anticuerpos marcados con TRIC		
NADPH, NADH	autofluorescencia	
pigmentos fotosintéticos		
Diacetato de fluoresceína (FDA)	permeabilidad membrana celular	
Ioduro de propidio		
3,3'-dihexilosacarbocianida (diOCn)	potencial de membrana	
Rodamina 120	cadena respiratoria mitocondrial	

Las medidas de dispersión anterior o frontal se toman en un detector que recoge la luz del láser dispersada entre 1 y 20° respecto al haz. Dicha medida se correlaciona principalmente con el tamaño celular, aunque puede estar influida por la estructura y composición intracelular (vesículas, concentración de ribosomas, etc.).

La dispersión de 90° respecto al haz de láser se recoge por las lentes situadas en esta posición junto a las emisiones de fluorescencia y posteriormente se separa en la cámara de detectores mediante un espejo dicróico para su valorización. Esta medida se correlaciona con la estructura intracelular, como relación núcleo-citoplasma o vesiculación, y se la denomina generalmente granularidad o complejidad celular.

A diferencia de la luz de láser, los parámetros dependientes de las emisiones de fluorescencia son mucho más versátiles y dependen hasta cierto punto de la capacidad de diseñar procesos de tinción que relacionen la variación del parámetro deseado con una cierta emisión de fluorescencia. La Tabla I enumera los más utilizados, con algunos de los fluorocromos más comúnmente asociados a dichos parámetros.

Objetivo

La contaminación de los mares por metales pesados es objeto de gran atención ya que puede causar graves problemas sanitarios. Las microalgas se han utilizado como indicadores biológicos para este propósito, debido fundamentalmente a su papel en el primer eslabón de la cadena trófica. Dentro de las microalgas, las diatomeas son particularmente sensibles a la toxicidad ejercida por los metales pesados.

El cobre es un micronutriente esencial para las microalgas pero a elevadas concentraciones resulta altamente tóxico, por lo que se ha utilizado tradicionalmente como algicida.

La mayoría de los estudios realizados acerca de la toxicidad que los metales pesados ejercen sobre las microalgas se han centrado fundamentalmente en la inhibición del crecimiento o la alteración de la tasa de fotosíntesis. Sin embargo, son pocos los trabajos que estudian la respuesta celular de las microalgas ante concentraciones subletales de cobre en el medio.

La citometría de flujo es una técnica que permite realizar estudios sobre la situación estructural y metabólica de células aisladas, lo que ha permitido un amplio desarrollo de sus aplicaciones en biomedicina; sin embargo, no se han desarrollado todavía aplicaciones para el estudio de los parámetros celulares de las microalgas.

En función de lo anteriormente expuesto, el objetivo que nos planteamos en este trabajo es estudiar la respuesta de la diatomea marina *Phaeodactylum tricorutum* frente a diferentes concentraciones de cobre, tanto a nivel de parámetros tradicionalmente estudiados en ensayos de toxicidad (crecimiento, fotosíntesis), como a otros niveles tanto fisiológicos como estructurales.

Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos parciales:

- estudio de los efectos del cobre sobre el crecimiento en función de la densidad celular del inóculo, a partir de los cuales se establecerán las condiciones para realizar los restantes ensayos

- estudio de los efectos del cobre sobre la fotosíntesis, contenido intracelular de ATP, composición relativa de los pigmentos fotosintéticos e incorporación de ^3H -timidina
- puesta a punto de técnicas de citometría de flujo para analizar células microalgales y determinación de parámetros celulares y fisiológicos por estas técnicas
- estudio de la acumulación de cobre por células microalgales
- estudio de la interacción del cobre con otros metales.

Materiales y métodos

DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE MICROALGAL UTILIZADA, *Phaeodactylum tricornutum* BOHLIN

Esta especie microalgal pertenece al grupo de las Chrysophyta, dado que las células poseen cromatóforos dorado-marrones y desarrollan una pared silíceas. Por presentar división vegetativa longitudinal, valvas silíceas del tipo diatomea pennada, movimiento de deslizamiento, etc., se incluye en la clase Bacillariophyceae (Volkman *et al.*, 1981). Dentro de esta clase pertenece al orden Bacillariales, suborden Naviculineae y familia Cymbelaceae (Werner, 1977).

P. tricornutum es una especie unicelular, que en condiciones especiales puede formar cadenas. Cada célula contiene dos cloroplastos, un núcleo simple, varias mitocondrias, cuerpos de Golgi, retículo endoplasmático y ribosomas (Chiapelli *et al.*, 1979). Presenta forma de huso (Foto 1), y su tamaño celular es de 8-12 μm de longitud por 1-2 μm de diámetro.

Posee cuatro membranas alrededor del cloroplasto. La membrana de éste presenta tres tilacoides por lámina, con interconexiones entre las láminas y conexiones con el retículo endoplasmático. No posee almidón en el cloroplasto, siendo las sustancias de reserva leucosina y lípidos. Los pigmentos presentes en esta microalga son: clorofilas a, c_1 , c_2 , carotenos, fucoxantina, neofucoxantina, diadinoxantina y diatouxantina, y a diferencia de otras diatomeas no contiene carotenoides menores ni clorofila c_3 (Weber, 1971; Jorgensen, 1977; Chiapelli *et al.*, 1979; Roy, 1988; Jeffrey & Stauber, 1985; Wright *et al.*, 1991).

CULTIVO DE *Phaeodactylum tricornutum*

La especie microalgal utilizada, *Phaeodactylum tricornutum*, fue aislada de aguas de la Ría de Arousa por el Dr. Fábregas (Dpto. Microbiología y Parasitología. Universidad de Santiago de Compostela). Se mantiene en cultivos "stock" que se doblan periódicamente para mantener el crecimiento en fase logarítmica. Estos cultivos se realizan con una iluminación de 68.25 $\mu\text{moles photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionada por tubos fluorescentes MAZDA fluor, aplicada con un ritmo nictimeral de 12:12, en una cámara de temperatura controlada y

constante a $18 \pm 1^\circ\text{C}$. Los cultivos no son aireados ni agitados mecánicamente, y a partir de ellos se toman los inóculos utilizados en las diferentes experiencias.

Los cultivos se realizan en agua de mar natural enriquecida con nutrientes. El agua de mar utilizada se filtra por filtros de acetato de celulosa de $0.45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro (MF-Millipore), con el fin de eliminar la materia particulada en suspensión, y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

El medio de cultivo utilizado en los cultivos "stock" es el definido por Fábregas *et al.* (1984), pero sin EDTA:

Tiamina	35 μg
Biotina	5 μg
B ₁₂	3 μg
Tris-HCl, pH 7.4	15 mM
NO ₃ Na	2 mM
PO ₄ H ₂ .2H ₂ O	100 μM
Citrato férrico	20 μM
Cl ₂ Zn	1 μM
Cl ₂ Mn.4H ₂ O	1 μM
MnO ₄ Na ₂ .2H ₂ O	1 μM
Cl ₃ Co	0.1 μM
SO ₄ Cu.5H ₂ O	0.1 μM
Agua de mar natural	1 litro

Los nutrientes se esterilizan en autoclave a 121°C durante 20 minutos, se guardan en oscuridad a 4°C y se añaden al agua de mar antes de inocularla.

Los efectos sinérgicos o antagónicos que se puedan producir en el medio no se tienen en cuenta generalmente en los estudios de laboratorio acerca de la toxicidad de metales sobre las microalgas. La interacción entre los iones metálicos y el medio de cultivo utilizado es un factor crítico en la determinación de los umbrales de toxicidad de un ion metálico. Así, la cantidad de metal añadido a un medio puede diferir mucho de la concentración final detectada en el medio como ion libre. El metal puede existir como ion libre, o formando parte de complejos

inorgánicos u orgánicos, lo cual afecta a la disponibilidad del metal. Es por ello, que en las experiencias llevadas a cabo con metales no se añaden los nutrientes, con el fin de evitar posibles formaciones de complejos entre las sustancias del medio y el metal adicionado.

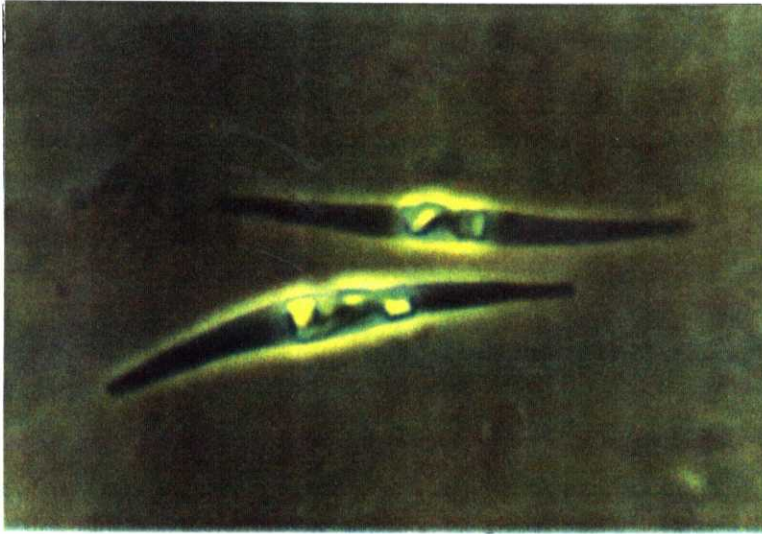


Foto 1.- Microfotografía de células de *Phaeodactylum tricornutum* realizada en un microscopio de contraste de fases con un objetivo de 100X.

PREPARACIÓN DEL MATERIAL UTILIZADO EN LAS EXPERIENCIAS CON METALES

Agua de mar.- El agua de mar utilizada en los experimentos es agua de mar natural filtrada por filtros de acetato de celulosa (MF-Millipore) de 0.45 μm de tamaño de poro, con el fin de eliminar la materia particulada en suspensión. Posteriormente se pasa por un cartucho de carbono activo para eliminar los compuestos orgánicos del agua que pudieran quelar los metales. Por último, se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos, al igual que la utilizada en los cultivos "stock".

Lavado del material.- Uno de los principales problemas que se plantean en los estudios de toxicidad de los iones metálicos en medio líquido son las posibles variaciones de dichos iones debido a que el metal pueda quedar adsorbido en las paredes del recipiente, con lo que al añadir el cultivo la concentración final pueda ser muy diferente a la esperada.

Por ello, el tratamiento de lavado al que se debe someter todo el material a utilizar, tanto para las soluciones "stock" de los metales como para los recipientes de cultivo, es el siguiente:

- Lavado del material con un detergente neutro, permaneciendo en él durante 24 horas.
- El material que está en detergente se enjuaga repetidamente con agua destilada y se introduce 48 horas en HNO_3 al 10%.
- Lavado del material con agua filtrada por un sistema Milli-Q de Millipore, dejándolo en ella durante 24 horas.
- Esterilización a 121°C durante 10 minutos.

Soluciones "stock" de los metales utilizados.- El recipiente que las va a contener ha de ser tratado previamente tal y como se indica en el apartado anterior.

Las soluciones "stock" se preparan disolviendo los diferentes metales (en forma de cloruros) en agua filtrada por el sistema Milli-Q, de forma que se obtenga una concentración de 1 g l^{-1} del metal, lo que nos permitirá obtener, añadiendo la cantidad adecuada de esta solución, los rangos de concentración deseados en las experiencias.

CRECIMIENTO

La densidad celular de los cultivos se determina diariamente por conteo en cámara hematológica del número de células microalgales presentes en una alícuota tomada de cada uno de los cultivos, utilizando para ello un microscopio NIKON Labophot de contraste de fases, a 400 aumentos.

En la fase estacionaria se calcula la tasa de crecimiento (μ), expresada en doblajes día⁻¹, a partir de la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln(N_t) - \ln(N_0)}{\ln 2(t-t_0)}$$

dónde t_0 y t son el tiempo inicial y final del periodo estudiado, ambos expresados en días, y N_t y N_0 el número de células ml⁻¹ en esos tiempos.

En términos generales, el crecimiento de una población microalgal en condiciones estáticas se caracteriza por ajustarse a una función sigmoide o logística (Schanz & Zahler, 1981). La función logística se utiliza en ecología como modelo del crecimiento de una población. Se caracteriza por un crecimiento exponencial, con un crecimiento próximo a cero cuando la población se aproxima a su máximo, lo que se conoce como la capacidad de carga del medio (Odum, 1971).

La representación matemática de esta función es:

$$N_t = \frac{K}{1 + B \exp(-zt)}$$

dónde N_t representa la densidad de población en el tiempo t , expresada en células x10⁴ml⁻¹, K es la capacidad de carga del medio o tamaño límite de la población, B es una constante que carece de significado biológico, y cuyo valor se calcula a partir de la siguiente ecuación: $B = (K - N_0) / N_0$. El parámetro z está relacionado con la tasa de crecimiento y t es el tiempo expresado en días. Todos los parámetros de la ecuación se calculan mediante una regresión no lineal, utilizando el algoritmo de Marquadt (Saila *et al.*, 1988).

MEDIDA DE LA INCORPORACIÓN DE ³H-TIMIDINA

La tasa de asimilación de ³H-timidina se utiliza para determinar el posible efecto del cobre sobre la síntesis de ácidos nucleicos, como medida indirecta del crecimiento de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*. El protocolo utilizado para la medida de la ³H-timidina ha sido el desarrollado por Fuhrman & Azam (1982) y descrito por Tubbing & Admiraal (1991b), adaptándolo para microalgas marinas.

Para estudiar la incorporación de la ³H-timidina dentro de las células microalgales se parte de cultivos sincronizados y en fase exponencial de crecimiento. El cobre se adiciona a los cultivos e inmediatamente se colocan en la cámara de cultivo con luz. Después de 12 horas de luz y exposición al cobre se adiciona la ³H-timidina (1µl de una solución 1x10³ nM de timidina marcada por cada ml de cultivo), inmediatamente antes de iniciarse la fase de oscuridad, y durante una hora, cada 15 minutos se realiza la recogida de muestras. Los pasos del proceso son los siguientes:

- 1) 20 ml de cultivo se filtran a través de filtros de membrana de ésteres mezclados de celulosa (MF-Millipore), de 1.2 µm de diámetro de poro, utilizando para ello un sistema multifiltro de Millipore, acoplado a una bomba de vacío, y en el que se han dispuesto tubos de ensayo para la recogida de los sobrenadantes.
- 2) Sobre las células retenidas en el filtro se vierten 10 ml de ácido tricloroacético (TCA) frío al 10% y se incuba durante 15 minutos, con el fin de parar la reacción de incorporación de la timidina a la célula y precipitar los ácidos nucleicos y eliminar el isótopo que pudiera quedar retenido en los filtros.
- 3) Transcurridos los 15 minutos, se filtra el TCA 10% y se lavan dos veces los filtros con 5 ml de TCA 5% frío.
- 4) Los filtros se retiran de la bandeja del multifilter y se colocan en viales de centelleo plásticos de 20 ml de capacidad.
- 5) A cada vial se le añaden 10 ml de líquido de centelleo Insta-gel II de Packard.

6) Las muestras se cuentan durante 1 minuto en un contador de centelleo líquido LKB Pharmacia.

Los resultados se expresan como desintegraciones por minuto (dpm) a partir de las cuales se calcula la tasa de incorporación de timidina, expresada como femtomoles de timidina incorporada por mililitro de cultivo y hora (fmoles timidina $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$).

DETERMINACIÓN DE LA TASA DE FOTOSÍNTESIS

El efecto del cobre sobre la tasa de fotosíntesis de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* se determina utilizando la técnica de asimilación de ^{14}C -bicarbonato como medida indirecta del proceso de fotosíntesis.

La utilización de isótopos radiactivos permite investigar gran número de fenómenos físicos, químicos y biológicos. Se utiliza una traza de radioisótopo y se supone que su comportamiento es igual al de su duplicado no radiactivo. Como el marcador se detecta fácilmente por su radiactividad, proporciona información sobre el comportamiento de la forma no radiactiva que no podría obtenerse por otros métodos. Para que el uso de radioisótopos sea más efectivo se requiere un método sensible de detección. Entre ellos el contador de centelleo líquido permite la cuantificación de bajos niveles de radioactividad (Neame & Homewood, 1974).

Las partículas emitidas tienen poco poder de penetración y se detienen fácilmente por interacción con la materia. Su energía varía desde 0 hasta un máximo que es constante para cada modelo particular de desintegración. Este máximo es lo que se conoce como energía de la partícula β y para el ^{14}C es 0.159 MeV; su vida media física es de 5760 años y biológica de 10 a 40 días.

Para la medida de muchos radioisótopos el contador de centelleo tiene la máxima sensibilidad y hace posible la medida exacta de cantidades muy pequeñas. En este tipo de instrumentos, la energía de la radiación emitida es absorbida por un material fluorescente y reemitida como fotones de luz; éstos son detectados por un fotomultiplicador y convertidos en señal eléctrica para su análisis. Este tipo de instrumentos es particularmente adecuado para las medidas cuantitativas de radiación con un poder de penetración limitado, como son las partículas β y los rayos X suaves (Deme, 1971; Venverloo, 1971).

Para estudiar la incorporación de un isótopo determinado dentro de las células microalgales se parte de cultivos sincronizados y en fase exponencial de crecimiento. El ^{14}C -bicarbonato se adiciona en fase de oscuridad, inmediatamente antes de iniciarse la fase de luz, y después de los periodos de incubación determinados se realiza la recogida de muestras. Los pasos del proceso son los siguientes:

- 1) 10 ml de cultivo se filtran a través de filtros Millipore de fibra de vidrio utilizando un sistema multifiltro de Millipore, acoplado a una bomba de vacío, y en el que se han dispuesto tubos de ensayo para la recogida de los sobrenadantes.
- 2) Las células retenidas en el filtro se lavan dos veces con 5 ml de agua de mar acidulada con HCl (0.01 N), con el fin de parar la reacción de incorporación del bicarbonato a la célula y eliminar el isótopo que pudiera quedar retenido en los filtros.
- 3) Los filtros se retiran de la bandeja del multifiltro y se colocan en viales de centelleo plásticos de 20 ml de capacidad.
- 4) A cada vial se le añaden 10 ml de líquido de centelleo Insta-gel II de Packard.
- 5) Las muestras se cuentan durante 2 minutos en un contador de centelleo líquido LKB Pharmacia.

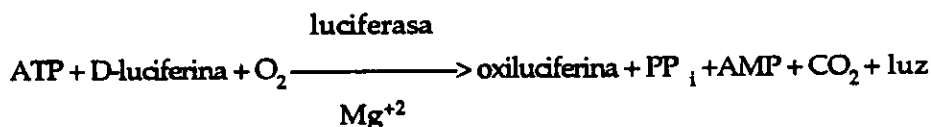
Los resultados se expresan como desintegraciones por minuto (dpm) a partir de las cuales se calcula la tasa de incorporación de carbono, expresada como $\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

DETERMINACIÓN DEL ATP CELULAR

Para la determinación del contenido celular de ATP, los cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* con las distintas concentraciones de cobre se preparan durante la fase de oscuridad e inmediatamente se colocan en la cámara de cultivo con luz. Transcurridas 8 horas de exposición a la luz y al metal, se toma una alícuota (20 ml) de cada cultivo y se procesa para la medición del ATP.

El contenido de ATP se determina por el método de la luciferina-luciferasa. Los sustratos y enzimas necesarios se obtienen a partir del "kit" "ATP Bioluminescence CLS" de Boehringer Mannheim Biochemica y su preparación se realiza como se indica en el protocolo que acompaña al producto. De igual forma se preparan los patrones de ATP necesarios para obtener una recta de calibración.

La cuantificación de ATP se realiza en base a la luz emitida por la reacción del enzima, que es dependiente de la cantidad de ATP presente en el medio:



Para medir esta luz emitida se utiliza un contador de centelleo LKB debidamente programado para tal fin.

El ATP celular se extrae utilizando un método descrito por Larsson y Olsson (1979). Se toman alícuotas de 20 ml de cada cultivo, se centrifugan y a las células así obtenidas se les añaden 10 ml de una solución tampón Tris-EDTA calentada hasta la ebullición (20 mM Tris y 2 mM EDTA, pH=7.75 ajustado con ácido acético). A continuación los tubos con la suspensión de células se transfieren inmediatamente a un baño a 100°C y se incuban durante 2 minutos.

De cada tubo se toma una alícuota, se le añade la solución de enzima e inmediatamente después de la adición se mide la luz emitida en el contador de centelleo LKB.

Una vez obtenidas las mediciones se utiliza la recta de calibrado para relacionar la luz emitida con la cantidad de ATP presente en las muestras.

ANÁLISIS DE LOS PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Existen numerosos métodos para la determinación de pigmentos microalgales, cada uno de ellos con un nivel de sofisticación y precisión diferente. El rango de los métodos más utilizados va desde los métodos espectrofotométricos y fluorimétricos para las clorofilas *a*, *b* y *c*, y sus derivados libres de magnesio (Holm-Hansen *et al.*, 1965; Lorenzen, 1967; Strickland & Parsons, 1972; Jeffrey & Humphrey, 1975; Lorenzen & Jeffrey, 1980), a los métodos cromatográficos, que incluyen cromatografía en capa fina (Jeffrey, 1981), cromatografía en capa fina de alta resolución (HPLTC) (Wright & Jeffrey, 1987), y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (revisada por Roy, 1987).

Los métodos cromatográficos separan un buen número de clorofilas y carotenoides, que pueden ser utilizados como indicadores de la biomasa de especies microscópicas, como marcadores biológicos de diferentes tipos o clases de algas, o como medida de la productividad o de procesos de reciclaje (Jeffrey, 1974; Hooks *et al.*, 1988; Bjornland & Liaaen-Jensen, 1989; Strom & Welschmeyer, 1991).

Aunque en los últimos años se han publicado gran número de protocolos utilizando HPLC para estudiar fotopigmentos microalgales, ninguno de ellos parece ser el ideal para la resolución de todos los pigmentos. En el presente trabajo se ha utilizado el método de estimación de pigmentos por HPLC de Wright *et al.* (1991), con algunas modificaciones.

El protocolo utilizado es el siguiente: se recogen aproximadamente 6×10^6 células por centrifugación a 3500 rpm, 4°C y durante 10 minutos. La extracción de pigmentos de las células se lleva a cabo resuspendiéndolas en 1 ml de acetona:metanol (2:1) fría, y se someten a ultrasonidos durante 15 segundos a 4°C y en oscuridad. Se centrifuga 10 min a 3500 rpm y se recoge el sobrenadante; este lavado con acetona-metanol se repite 3 veces. El sobrenadante obtenido tras los lavados (extracto de pigmentos) se concentra por evaporación del solvente. La muestra seca se resuspende en 100 µl de metanol grado HPLC, protegiendo los tubos de la luz. De cada muestra se inyectan 10 µl en un cromatógrafo Hewlett-

Packard modelo HP 1050, utilizando una columna de fase reversa con una fase estacionaria no polar, Hewlett Packard ODS-Hypersil de 5 μm , 250 x 4 mm. Las condiciones de la cromatografía son: temperatura del inyector 40 °C, flujo 1 ml min^{-1} durante 20 minutos.

El sistema de solventes utilizados ha sido el de Wright *et al.* (1991) sin utilizar acetato de amonio como parte del solvente A, para lograr una mayor duración de la columna. El sistema utilizado ha sido:

solvente A) metanol (grado HPLC).

solvente B) 9:1 acetonitrilo:agua (grado HPLC)

solvente C) acetato de etilo (grado HPLC).

ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y FISIOLÓGICO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo (CMF) permite determinar un elevado número de funciones celulares a gran velocidad, utilizando una amplia variedad de moléculas bioquímicamente específicas, no tóxicas y fluorescentes, en condiciones muy cercanas al estado *in vivo* en exposiciones no prolongadas a niveles de luz muy elevados.

El tiempo de aceleración en un citómetro y el paso de la célula frente al haz de luz del láser se produce en unas fracciones de segundo, de modo que el proceso de medida ejerce una influencia mínima sobre las células. Además la CMF ofrece una estadística más fiable que el estudio al microscopio.

El tiempo de incubación con uno o varios fluorocromos varía entre 1 y 15 minutos. En la mayoría de los casos las células teñidas pueden analizarse inmediatamente, y en otros casos es necesaria la centrifugación y resuspensión en un tampón con una menor concentración extracelular del fluorocromo (por ejemplo, la rodamina 123). Este paso de centrifugación puede sustituirse por uno de dilución, cuando se utilizan volúmenes muy pequeños.

Los microorganismos marinos unicelulares presentan generalmente una fluorescencia natural muy fuerte procedente de la clorofila y sus derivados o de otros pigmentos como las ficobiliproteínas o xantofilas. De este modo, la determinación de los parámetros funcionales de estos microorganismos consiste en la determinación de la fluorescencia de la clorofila (aproximadamente a 645 nm), simultáneamente con las fluorescencias de las tinciones funcionales por debajo de 600 nm.

En nuestras experiencias los parámetros que consideramos son:

- el tamaño, granularidad y autofluorescencia de las células microalgales cultivadas en diferentes condiciones. Estos tres parámetros se estudian directamente a partir de las células en suspensión, sin utilizar ningún fluorocromo.

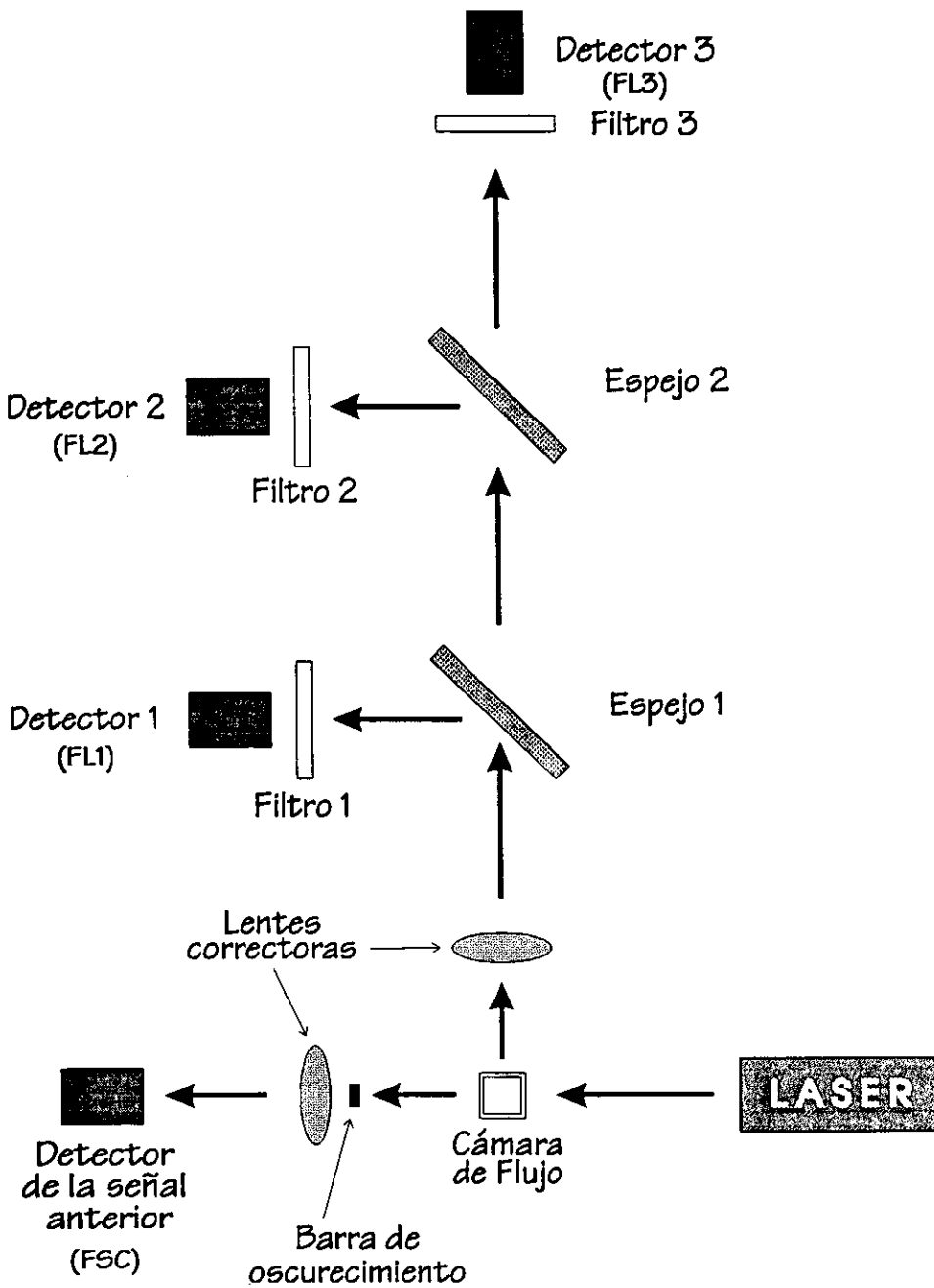


Figura 4.- Esquema general de los distintos componentes de un citómetro de flujo tipo.

-viabilidad celular, potencial de membrana celular y potencial de membrana mitocondrial, pH intracelular y actividad peroxidasa de las microalgas cultivadas en diferentes condiciones. Estos otros cuatro parámetros se estudian utilizando para ello fluorocromos específicos en cada uno de los casos, y que se detallan en los siguientes apartados.

En nuestros ensayos se recogen alícuotas de 250 µl de cada cultivo y se analizan al menos 5000 células de cada una de las réplicas de los diferentes cultivos. El citómetro utilizado es un FACScan de Becton-Dickinson y el programa de análisis utilizado es el LYSIS II de la misma marca. La fuente de luz que utiliza este citómetro es un laser de ion argón, que emite a 488 nm (luz azul).

La emisión fluorescente abarca el espectro visible y en el citómetro utilizado dicha fluorescencia es recibida por 3 detectores o fotomultiplicadores diferentes en función de la longitud de onda (Fig. 4):

- a) entre 510 - 540 nm se recoge en el detector 1 y se denomina de FL1, que es la fluorescencia verde, típica de la fluoresceína,
- b) entre 540-560 nm se recoge en el detector 2 y se denomina FL2, y es una fluorescencia anaranjada
- c) la fluorescencia por encima de 645 nm (fluorescencia de la clorofila *a*) se recoge en el detector 3, y se denomina de FL3.

TAMAÑO, GRANULARIDAD Y AUTOFLUORESCENCIA

Para el análisis de estos tres parámetros celulares las muestras se pasan directamente por el citómetro, sin necesidad de tinciones. Cuando una célula pasa frente al haz de láser en un citómetro de flujo produce una señal con una intensidad determinada; esta señal es detectada por un fotosensor que la convierte en un pulso electrónico cuya amplitud es proporcional a la intensidad de la señal. El pulso se procesa a través de amplificadores logarítmicos. El amplificador logarítmico convierte la amplitud de la señal en su logaritmo. En cada caso la amplitud del pulso semide en voltios y se convierte en un número canal, que varía entre 0 y 1023, para una resolución de 1024 canales. Este número canal es proporcional al logaritmo de la señal. El pico-canal se corresponde con el canal en el que aparece la moda de la distribución de datos en cada caso.

El tamaño celular se detecta en función de la luz refractada en un ángulo $<25^\circ$, lo que se conoce como luz refractada en el ángulo anterior ("forward light scatter" o FSC) (Fig. 4). La granularidad celular se detecta en función de la luz refractada en un ángulo $>68^\circ$, que es lo que se denomina luz refractada lateralmente ("side light scatter" o SSC).

Dado que la mayoría de los microorganismos marinos unicelulares presentan generalmente una fluorescencia natural muy fuerte, la autofluorescencia estudiada en este trabajo es la que se corresponde con la señal emitida por las clorofilas y pigmentos relacionados tras ser excitadas a 488 nm; la emisión fluorescente recogida es la que se encuentra por encima de los 645 nm (FL3).

DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

El yoduro de propidio (IP) es un fluorocromo que atraviesa la membrana de las células cuando éstas no son viables y presentan daños en su membrana celular, y una vez dentro se une al ADN. Después de esta unión a las bases del ADN, cuando se excita con luz azul a 488 nm procedente de un láser de ión argón emite fluorescencia en la banda del anaranjado (FL2), indicando que esa célula no es viable (Frankfurt, 1990; Grogan & Collins, 1990; Ormerod, 1990).

Las células (250 μ l de cultivo, con una densidad celular aproximada de 24×10^4 células por ml) se tiñen con yoduro de propidio, a partir de una solución "stock" de 1 mg ml^{-1} en HBS (tampón HEPES salino, "HEPES Buffered Saline", pH 7.4) para obtener una concentración final de 60 nM. Se incuba la muestra en oscuridad durante 5 minutos y se analiza en el citómetro en el espectro del rojo.

En todos los análisis efectuados por CMF se utiliza el fluorocromo y sólo se analizarán para los restantes parámetros aquellas células que no se tiñen con yoduro de propidio (IP), células viables normales.

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL TRANSMEMBRANA

Frecuentemente se han utilizado tinciones indicadoras para medir los cambios en los potenciales de membrana, especialmente en orgánulos o células demasiado pequeñas como para permitir la utilización de microelectrodos. Estos colorantes también pueden utilizarse como controles para detectar artefactos en las propiedades de la membrana causadas por técnicas electrofisiológicas (Grogan & Collins, 1990; Rabinovitch & June, 1990; Shapiro, 1990).

Las sondas sensibles a potenciales eléctricos incluyen las carbocianinas, que están cargadas positivamente, y son sondas de respuesta lenta. Las carbocianinas se acumulan en la célula durante la hiperpolarización donde, inicialmente y como monómeros, se orientan en paralelo a las cadenas de acilfosfolípidos. Sin embargo, al seguir acumulándose se reorientan formando dímeros perpendicularmente alineados, que exhiben tanto una absorción alterada como una emisión difuminada ("quenched") (Badley *et al.*, 1973; Yguerabide & Stryer, 1971). Cambios en la fluorescencia de estas sondas (>80%) se deben a la redistribución del colorante dentro de la membrana.

La utilización de carbocianinas para medir el potencial de membrana es relativamente simple y permite la monitorización de células aisladas utilizando equipamientos estándar, como pueden ser los citómetros de flujo. Estas carbocianinas generalmente tiñen las membranas mitocondriales y con frecuencia son tóxicas para las células (Grogan & Collins, 1990).

El 3,3'-dihexyloxcarbocianina yoduro, abreviadamente conocida como DiOC₆(3), se ha utilizado para visualizar el retículo endoplasmático, tanto en células vivas como en células fijadas con glutaraldehído (Terasaki *et al.*, 1986). Tanto este colorante como el DiOC₅(3) han sido intensivamente utilizados desde entonces para estudiar interacciones estructurales y la dinámica del retículo endoplasmático (Terasaki, 1990; Lee & Chen, 1988). Ambos colorantes pasan a través de la membrana plasmática y tiñen todas las membranas intracelulares con un espectro de emisión semejante al de la fluoresceína.

Para la determinación del potencial transmembrana se utiliza una técnica de citometría de flujo (Hasmann *et al.*, 1989), modificada para las células microalgales. El fluorocromo utilizado es el 3,3'-dihexyloxacarboianina ($\text{DiOC}_6(3)$), que presenta un máximo de absorción a 484 nm y emite a 501 nm (FL1 en nuestro citómetro).

El protocolo utilizado es el siguiente:

- 1) A 250 μl de la suspensión celular (24×10^4 células ml^{-1}) se le adicionan 5 μl de una solución de $\text{DiOC}_6(3)$ 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (diluido 1/100 en dimetilformamida a partir de una solución stock 1 mg ml^{-1} en etanol) y 5 μl de IP 1 mg ml^{-1} en HBS.
- 2) Se incuba durante 5 minutos en oscuridad y temperatura ambiente.
- 3) Se analiza la muestra en un citómetro de flujo, excitando a 488 nm.

Las concentraciones finales de los diferentes compuestos son: $\text{DiOC}_6(3)$ 0.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (0.35 μM), IP 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (30 μM).

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Las mitocondrias son los orgánulos celulares responsables del metabolismo aeróbico de las células eucariotas. Su abundancia varía con el nivel energético celular, y es función del estado dentro del ciclo celular y del estado de proliferación. Algunos agentes farmacológicos (anestésicos, por ejemplo) alteran la función mitocondrial (Haugland, 1992), y este efecto se puede estudiar mediante la utilización de colorantes mitocondriales selectivos. Algunos autores han utilizado la rodamina 123 (R123) en citometría de flujo para separar físicamente diferentes poblaciones de levaduras deficientes en su función mitocondrial (McConnell *et al.*, 1990, citado en Haugland, 1992), o para separar aquellos linfocitos que son responsables de la estimulación mitogénica (Darzynkiewicz *et al.*, 1981).

La rodamina 123 es un fluorocromo de peso molecular 381, soluble en metanol y dimetil-formamida. Presenta un máximo de absorción a 505 nm y su emisión máxima cuando está disuelta en metanol es 534 nm; se detecta como fluorescencia verde (en nuestro estudio, FL1) o como amarillo-anaranjado. Es un compuesto permeable a las células, catiónico y relativamente poco tóxico, y es secuestrado activamente por las mitocondrias activas sin distorsión aparente. La rodamina 123 se ha utilizado en el estudio de resistencia a multidrogas (Neyfakh, 1987), actividad enzimática mitocondrial (Lynch *et al.*, 1991), y en el estudio del potencial de transmembrana mitocondrial, además de en otras actividades de membrana (Evenson *et al.*, 1982; Haugland, 1992). También se ha utilizado en el estudio de los procesos del ciclo celular (Darzynkiewicz *et al.*, 1981; Darzynkiewicz & Andreeff, 1981) y en el transporte axoplásmico de mitocondrias, y en la tinción de los terminales nerviosos presinápticos, de bacterias vivas y de las células intersticiales de Cajal (Haugland, 1992).

Para la determinación del potencial de membrana mitocondrial se utilizó una técnica de citometría de flujo (Collins & Foster, 1983), modificada para las células microalgales. El fluorocromo utilizado es la rodamina 123 (R123), y se han seguido los siguientes pasos:

- 1) A 250 μl de la suspensión celular (24×10^4 células ml^{-1}) se le añaden 2.5 μl de R123 0.5 mg ml^{-1} en dimetil-formamida (DMF).
- 2) Se incuba la muestra durante 5-10 minutos a temperatura ambiente.
- 3) Se diluye la muestra para evitar un exceso de fluorescencia en el medio con 1 ml de HBS, y se añaden 5 μl de IP 1 mg ml^{-1} en HBS.
- 4) Se incuba la muestra durante 5 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.
- 5) Se analiza la muestra en un citómetro de flujo, excitando a 488 nm.

Las concentraciones finales de los compuestos utilizados fueron: R123 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (26 μM), IP 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (30 μM).

DETERMINACIÓN DEL pH INTRACELULAR

Las proteínas son sensibles a cambios en las concentraciones de protones de su medio, y el pH regula la actividad de determinadas enzimas y diferentes pasos metabólicos (Kurkdjian & Guern, 1989). El control del pH intracelular en células animales es fundamental a la hora de que se lleven a cabo importantes procesos fisiológicos, como la síntesis de determinadas proteínas, síntesis de ADN y ARN (Ober & Pardee, 1987; Pouyssegur *et al.*, 1985), el control del ciclo celular y cambios en la conductividad de la membrana para los iones (Kurkdjian & Guern, 1989). El pH citoplasmático se mantiene próximo a la neutralidad mediante potentes mecanismos de intercambio iónico del plasmalema y por la elevada capacidad tampón del citosol.

Las medidas del pH intracelular pueden llevarse a cabo mediante a) la utilización de sondas químicas, b) con microelectrodos H⁺-selectivos, o bien c) por espectroscopía de resonancia magnética nuclear con ³¹P, dado que la frecuencia relativa de los compuestos de ³¹P es pH-dependiente.

La utilización de sondas químicas para la medida del pH intracelular se basa en la difusión diferencial a través de las membranas de las moléculas sonda fluorescentes o marcadas radiactivamente. Estas sondas se disocian fuera y dentro de la célula de acuerdo con el pH del compartimento y se establece un equilibrio de difusión entre las células y el medio. La concentración intra- y extracelular de la sonda se mide una vez alcanzado el equilibrio.

En los últimos años han aparecido otras sondas fluorescentes, cuya fluorescencia varía según el pH de la célula. La mayoría de sondas fluorescentes más utilizadas para la medida del pH intracelular son derivados de la fluoresceína. El espectro de la fluoresceína es pH-dependiente; los picos de emisión y absorción disminuyen considerablemente con los pH ácidos. Sin embargo, la longitud de onda y la forma de los picos de emisión de todos los derivados de la fluoresceína son relativamente independientes del pH (Haugland, 1992).

Para la determinación del pH intracelular se utiliza una técnica de citometría de flujo basada en la diferente intensidad de emisión fluorescente de la fluoresceína

(Vissier *et al.*, 1979), modificada para las células microalgales. El fluorocromo utilizado es la diclorofluoresceína, abreviadamente DCF, cuya emisión fluorescente se recoge en el espectro de la fluorescencia verde (FL1).

El protocolo utilizado es el siguiente:

- 1) A 250 μl de la suspensión celular (24×10^4 células ml^{-1}) se le añaden 5 μl de DCF $0.487 \mu\text{g ml}^{-1}$ y 5 μl de IP 1 mg ml^{-1} en HBS.
- 2) Se incuba la muestra durante 5 minutos, en oscuridad y temperatura ambiente.
- 3) Se analiza la muestra en un citómetro de flujo, excitando a 488 nm.

La concentración final de los fluorocromos utilizados es: DCF $20 \mu\text{M}$; IP $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($30 \mu\text{M}$).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA

Los sustratos fluorogénicos de las peroxidasas, como son las dihidro-fluoresceinas, dihidro-rodaminas y dihidro-etidio, se convierten enzimáticamente en productos altamente fluorescentes en presencia de peróxido de hidrógeno (Watson *et al.*, 1990).

La viabilidad celular puede determinarse mediante el estudio de la capacidad oxidativa de las células (Haugland, 1992). Por ejemplo, la dihidrorodamina 123 es oxidada a rodamina 123 por los neutrófilos viables durante la actividad respiratoria (Rothe *et al.*, 1988) y también tiñe las mitocondrias de las células vegetales viables. El dihidro-etidio o hidroetidina (HE) se ha utilizado últimamente para analizar la actividad respiratoria en fagocitos (Rothe & Valet, 1990).

La hidroetidina (HE) es un fluorocromo químicamente reducido con fluorescencia azul en el citoplasma, que es oxidado a etidio en el citoplasma de células viables, por una reacción de peroxidación. El etidio es un colorante específico de ADN, que emite fluorescencia roja (FL2 en el citómetro de flujo utilizado en este estudio) cuando se intercala con el ADN (Bucana *et al.*, 1986).

La hidroetidina se mantiene en una solución "stock" a una concentración 3.15 mg ml^{-1} en DMF, a -180°C , y antes de utilizarse se refrigera a -85°C . A una alícuota de $250 \mu\text{l}$ de cultivo (24×10^4 células ml^{-1}) se añaden $5 \mu\text{l}$ de esta solución diluida 1/2 en HBS (1.57 mg/ml de HE en HBS), se incuba durante 7 minutos a temperatura ambiente y se lee la señal que se produce en el espectro del rojo en el citómetro.

DETERMINACIÓN DE LA BIOACUMULACIÓN DE COBRE

La determinación de la cantidad de cobre retirado del medio por la microalga ensayada, *Phaeodactylum tricornutum*, se realiza utilizando un método de espectrofotometría de absorción atómica basado en el descrito por Stauber & Florence (1985b).

Se exponen las células a diferentes concentraciones de cobre y transcurridas 72 horas de exposición al metal, se separan dos fracciones con un número suficiente de células a partir del cultivo original: una de ellas se utiliza para medir el cobre total retirado por las células microalgales (cobre intracelular y cobre adsorbido a la superficie microalgal), y la otra se utiliza para medir el cobre intracelular.

Para la determinación del cobre total retirado, se filtra una de las alícuotas del cultivo a través de filtros de ésteres de celulosa MF-Millipore de 0.45 μm de diámetro de poro. Cada uno de los filtros se digiere con 1ml de HNO_3 15 M y 0.5 ml de HClO_4 al 72%. El proceso de digestión dura hasta que aparecen humos derivados del ácido perclórico. Finalizado el proceso de digestión se diluye la muestra hasta 5 ml con agua filtrada por un sistema Milli-Q de Millipore. La concentración de cobre en la muestra se determina por espectrofotometría de absorción atómica en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 2380.

Para la determinación del cobre intracelular se recogen las células por centrifugación de la otra alícuota del cultivo. Las células recogidas por centrifugación se resuspenden en una solución de EDTA 0.02 M en agua de mar, con el fin de eliminar el cobre adsorbido en la superficie microalgal. Después de 20 min, las células se centrifugan de nuevo y se digieren como se ha descrito anteriormente. La cantidad de cobre en la muestra se mide por espectrofotometría de absorción atómica.

El cobre adsorbido a la superficie celular se calcula a partir de la diferencia entre las dos fracciones medidas anteriormente (Stauber & Florence, 1985b).

TRATAMIENTO DE DATOS

El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el "software" estadístico SPSS/PC+ versión 4.10 (SPSS Inc.).

Para cada densidad inicial de cultivo, la hipótesis de que la concentración de cobre del medio no afecta a la densidad celular alcanzada en fase estacionaria, se analiza mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA).

Cuando la hipótesis se rechaza, se emplea el test de rango múltiple de Duncan para analizar en qué forma afecta cada concentración de cobre al crecimiento obtenido.

El test de Duncan se aplica en todos los casos al nivel de significación 0.05.

La concentración de metal que reduce en un 50% cualquier parámetro analizado (EC_{50}) se calcula mediante el análisis Probit.

Para cada uno de los parámetros estudiados por citometría de flujo, se analiza un número suficiente de células (mas de 5000) y las medidas de fluorescencia se realizan en una escala logarítmica. La recogida de datos se lleva a cabo utilizando un "list mode". El "software" del citómetro de flujo utilizado proporciona los parámetros estadísticos de las distribuciones de los valores obtenidos mediante esta técnica; el programa utilizado es el "LYSIS II" de Becton Dickinson Instruments.

Resultados

EFFECTO DE LA DENSIDAD CELULAR INICIAL SOBRE LA TOXICIDAD DE COBRE SOBRE LA MICROALGA MARINA *P. tricornutum*

Objetivo

En los ensayos de toxicidad de cualquier agente el inóculo o número de células al comienzo del test debe adaptarse a los ensayos que se van a desarrollar (Hörström, 1990). A elevadas densidades celulares aumenta rápidamente por el aumento del número de partículas en el medio (células y productos de degradación de las células), las cuales ligarán gran parte del metal, variando las condiciones del estudio. Por otra parte, grandes concentraciones de nutrientes reducen la asimilación de las sustancias ensayadas.

Para los tests de toxicidad de la mayoría de los agentes contaminantes se consideran suficientes tiempos de exposición entre 72 y 96 horas, con 1 ó 2 medidas durante este tiempo, y este patrón puede ser aplicado a los tests con microalgas (Walsh & Merrill, 1984); tiempos de exposición mayores generalmente implican que la toxicidad del agente disminuya (Walsh et al., 1982).

En numerosos ensayos la toxicidad se mide en función de la reducción de la tasa de crecimiento, o biomasa final, en relación con el control. Con el fin de realizar posteriores estudios sobre las respuestas fisiológicas de las microalgas marinas es necesario conocer los niveles en los que un determinado ion produce efectos tóxicos sobre la microalga estudiada.

A lo largo de la bibliografía, las concentraciones de metales, en concreto de cobre, que producen efecto sobre la tasa de crecimiento de distintas microalgas son muy variadas, al igual que sucede con las concentraciones que producen la inhibición total de ese crecimiento. A la hora de comparar los resultados obtenidos por los distintos autores se observa una variable que generalmente no se tiene en consideración, y que es la densidad celular inicial del cultivo. Por ello, nos planteamos como primer objetivo estudiar cómo incide la densidad celular inicial del cultivo en el efecto de diferentes concentraciones de cobre sobre el crecimiento de las células de *P. tricornutum*.

Diseño experimental

Se establecen cultivos de la microalga marina *P. tricornutum* con distintas concentraciones de cobre en el medio. Los agentes tóxicos deben adicionarse en cantidades que sigan una progresión geométrica (Hörnström, 1990). Las concentraciones de cobre utilizadas son 0.025, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1, 2.5 y 5 mg l⁻¹, si bien las concentraciones superiores a 1 mg l⁻¹ únicamente se utilizan con las densidades celulares más altas; en todos los casos se realiza un cultivo control sin añadir cobre.

Los cultivos se realizan en tubos KIMAX de tapón de rosca de 16x2.5 cm, con 40 ml de agua de mar natural, filtrada por 0.45 µm y carbono activo, y sin adición de nutrientes. Las condiciones de esterilización, luz y temperatura, así como la forma de obtener el inóculo, se indican en el apartado de "Materiales y Métodos". Las densidades celulares iniciales de los cultivos son 3, 6, 12, 24 y 48 x 10⁴ células ml⁻¹. Todas las combinaciones de densidades celulares y concentraciones de cobre se llevan a cabo por triplicado.

Diariamente se determina la densidad celular de cada cultivo por recuento de células en cámara hematológica. Debido a las diferentes densidades celulares iniciales, se han utilizados dos tipos de cámaras: la cámara Neubauer (con un factor de multiplicación de 10⁴) en los cultivos con densidades iniciales de 12, 24 y 48 x 10⁴ células ml⁻¹ y la cámara Malassez (con un factor de multiplicación de 10³) en los cultivos con densidades iniciales de 3 y 6 x 10⁴ células ml⁻¹.

Los cultivos se mantienen durante 4 días (96 horas). Para cada tamaño de inóculo, los valores de densidad celular obtenidos a las 96 horas de exposición a las distintas concentraciones de cobre se comparan mediante un análisis de la varianza (ANOVA), y cuando se observan diferencias significativas, se analizan estos datos mediante el test de rango múltiple de Duncan. Se calculan las tasas de crecimiento de cada cultivo durante la fase de crecimiento exponencial y se determina la EC₅₀ mediante el análisis Probit para cada una de las densidades celulares ensayadas en los intervalos de tiempo de 48 y 96 horas.

Resultados

Las curvas de crecimiento de todos los cultivos realizados, expresadas en función de la densidad celular respecto al tiempo, se muestran en las figuras 5, 6, 7, 8 y 9.

En los cultivos con densidades celulares iniciales de 3 y 6×10^4 células ml^{-1} , concentraciones de 0.01 mg l^{-1} de cobre no inhiben el crecimiento, mientras que las restantes concentraciones de cobre ya afectan al crecimiento, inhibiéndolo total o parcialmente. En los cultivos con un inóculo de 3×10^4 células ml^{-1} , la inhibición es patente desde el primer día (24 horas) en los cultivos con 0.025 mg l^{-1} de cobre, que alcanzan una densidad celular máxima a las 96 horas de exposición al cobre de 23.50×10^4 células ml^{-1} , frente a 56.40 y 53.20×10^4 células ml^{-1} de los cultivos blanco y con 0.01 mg l^{-1} de cobre, respectivamente (Fig. 5, Tabla II). Con 0.05 mg l^{-1} de cobre la concentración celular final cae drásticamente a 9.80×10^4 células ml^{-1} , y a partir de aquí desciende en función a la concentración de cobre del medio, sin crecimiento con concentraciones de cobre superiores a los 0.50 mg l^{-1} (Fig. 5, Tabla II).

Los cultivos con inóculos de 6×10^4 células ml^{-1} son parcialmente inhibidos por 0.025 mg l^{-1} de cobre, sobre todo a partir de las 72 horas de cultivo (Fig. 6, Tabla II); los cultivos con 0.05 mg l^{-1} de cobre son también parcialmente inhibidos frente a los valores del control y de los cultivos con 0.01 mg l^{-1} , con una densidad celular máxima a las 96 horas de 23.30 , 78.40 y 86.23×10^4 células ml^{-1} , respectivamente (Fig. 6, Tabla II).

En los cultivos con 12×10^4 células ml^{-1} de inóculo, una concentración de cobre de 0.25 mg ml^{-1} es ya totalmente inhibitoria; los cultivos con 0.01 y 0.025 mg l^{-1} de cobre presentan valores de densidad celular a las 96 horas próximos e incluso superiores a los cultivos control (Fig. 7, Tabla II).

Teniendo en cuenta la densidad celular máxima a las 96 horas, en los cultivos con una densidad celular inicial de 24×10^4 células ml^{-1} (Fig. 8) se pueden hacer tres grupos de cultivos:

- 1) los cultivos no afectados, que no son significativamente diferentes de los cultivos control sin cobre,
- 2) aquellos cultivos con una inhibición parcial del crecimiento, y
- 3) los cultivos con una inhibición total del crecimiento.

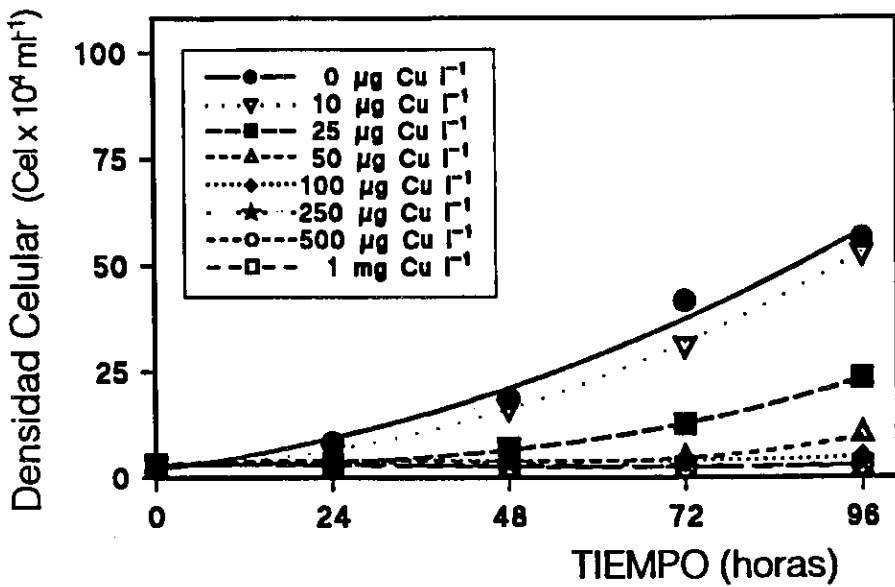


Figura 5.- Crecimiento de los cultivos (expresada en células $\times 10^4 \text{ ml}^{-1}$) de *Phaeodactylum tricornutum* con diferentes concentraciones de cobre y densidad celular inicial de 3×10^4 células ml^{-1} .

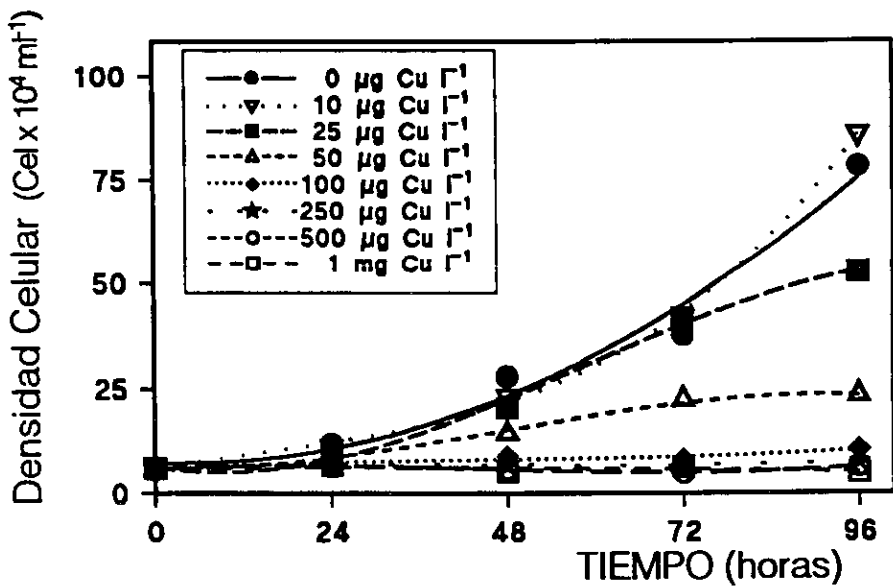


Figura 6.- Crecimiento de los cultivos (expresada en células $\times 10^4 \text{ ml}^{-1}$) de *Phaeodactylum tricornutum* con diferentes concentraciones de cobre y densidad celular inicial de 6×10^4 células ml^{-1} .

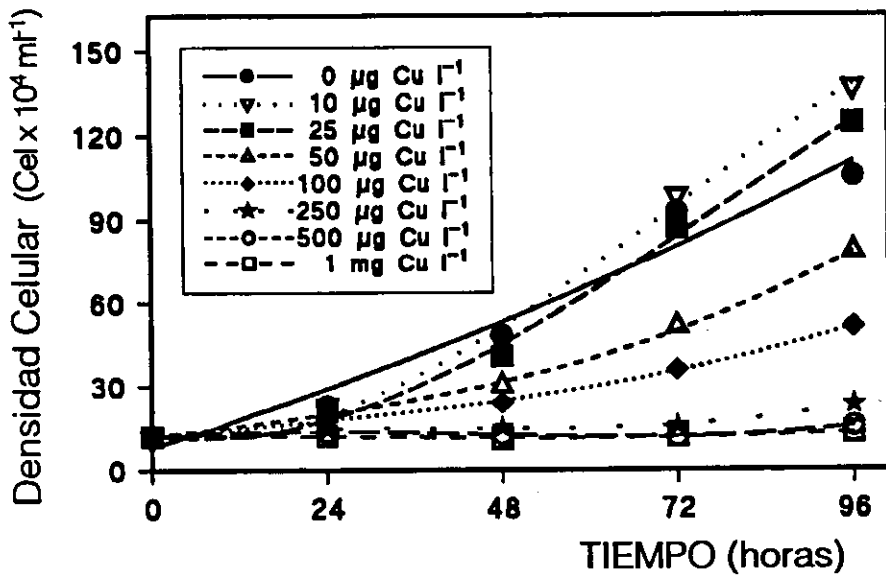


Figura 7.- Crecimiento de los cultivos (expresada en células $\times 10^4 \text{ ml}^{-1}$) de *Phaeodactylum tricornutum* con diferentes concentraciones de cobre y densidad celular inicial de 12×10^4 células ml^{-1} .

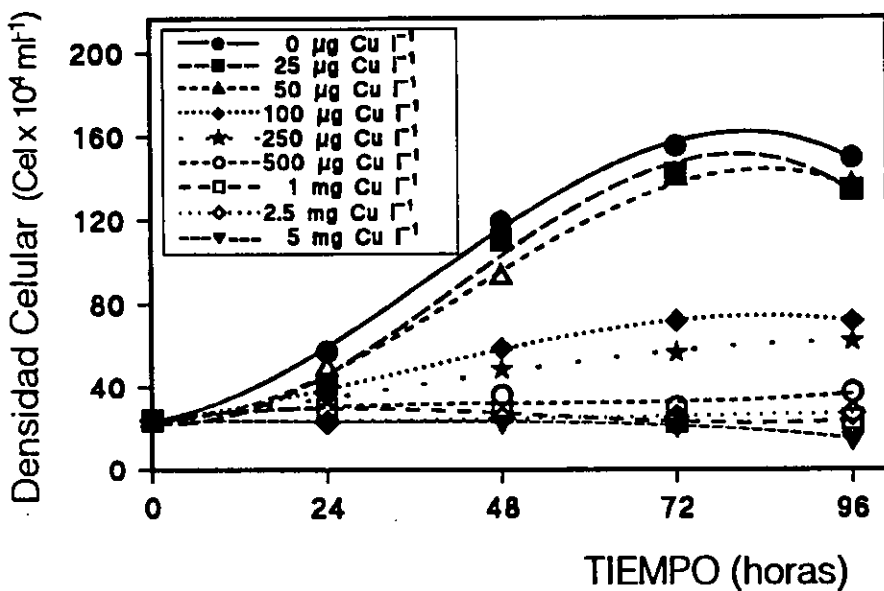


Figura 8.- Crecimiento de los cultivos (expresada en células $\times 10^4 \text{ ml}^{-1}$) de *Phaeodactylum tricornutum* con diferentes concentraciones de cobre y densidad celular inicial de 24×10^4 células ml^{-1} .

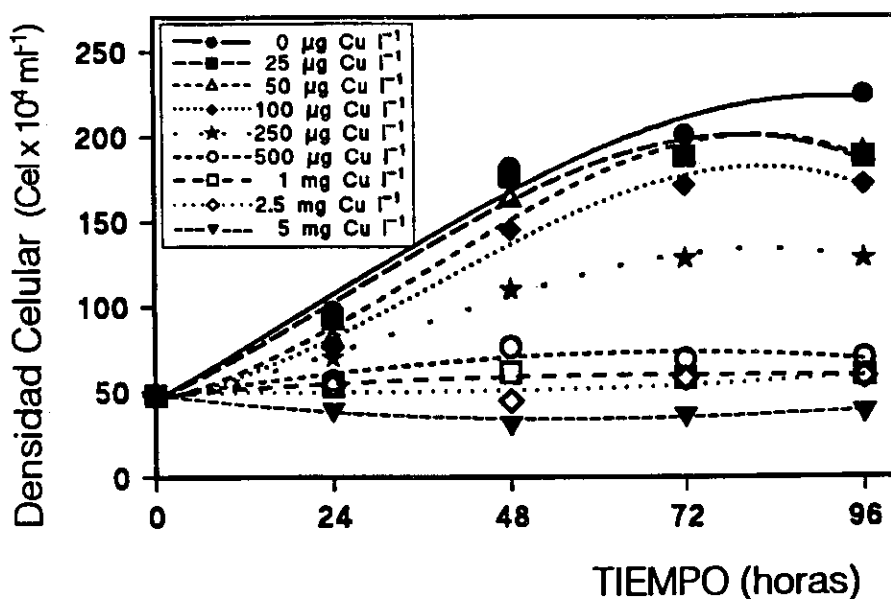


Figura 9.- Crecimiento de los cultivos (expresada en células $\times 10^4 \text{ ml}^{-1}$) de *Phaeodactylum tricornutum* con diferentes concentraciones de cobre y densidad celular inicial de $48 \times 10^4 \text{ células ml}^{-1}$.

El primer grupo incluye los cultivos con concentraciones de cobre igual o inferiores a 0.05 mg l^{-1} , que alcanzan densidades celulares máximas a las 96 horas entre $135 \times 10^4 \text{ células ml}^{-1}$ en los cultivos con 0.05 mg l^{-1} de cobre, y $134.12 \times 10^4 \text{ células ml}^{-1}$ en los cultivos con 0.025 mg l^{-1} de cobre, frente a la densidad de $149.25 \times 10^4 \text{ células ml}^{-1}$ obtenida en los cultivos control (Tabla II). En este primer grupo no existen diferencias significativas con los cultivos control sin cobre en cuanto a la densidad celular final de los cultivos.

El grupo de los cultivos parcialmente afectados incluye los cultivos con 0.10 , 0.25 y 0.50 mg l^{-1} de cobre, que alcanzan densidades celulares a las 96 horas que varían entre 71.62 y $37.50 \times 10^4 \text{ células ml}^{-1}$ (Tabla II), que ya difieren significativamente del control.

En el tercer grupo se incluyen los cultivos con 1 , 2.5 y 5 mg l^{-1} de cobre, sin diferencias significativas entre ellos, en los cuales no se observa crecimiento alguno a lo largo de las 96 horas de exposición al cobre, y cuyas densidades celulares a las 96 horas presentan valores entre 15×10^4 y $27.13 \times 10^4 \text{ células ml}^{-1}$ (Tabla II).

Tabla II.- Densidad celular máxima (expresada en 10^4 células ml^{-1}) en los cultivos de *P. tricornutum* con diferentes densidades celulares iniciales y distintas concentraciones de cobre (expresada en $mg l^{-1}$) (A) y tratamiento estadístico de los valores medidos mediante el test de Duncan ($P > 0.05$) (B). (N.D. = no determinado)

		Densidad celular inicial (células x $10^4 ml^{-1}$)					
		3	6	12	24	48	
A	[Cu]						
	Control	56.40 ± 7.60	78.40 ± 8.02	105.50 ± 12.17	149.25 ± 11.93	224.66 ± 41.13	
	0.01 $mg l^{-1}$	53.20 ± 2.80	86.23 ± 9.18	137.00 ± 11.13	N.D.	N.D.	
	0.025 $mg l^{-1}$	23.50 ± 1.95	52.70 ± 6.48	124.38 ± 14.71	134.12 ± 16.94	178.00 ± 15.09	
	0.05 $mg l^{-1}$	9.80 ± 0.80	23.30 ± 2.50	78.38 ± 10.52	135.00 ± 14.25	189.00 ± 17.27	
	0.1 $mg l^{-1}$	4.85 ± 0.25	10.65 ± 0.65	51.50 ± 14.71	71.62 ± 9.87	162.00 ± 14.39	
	0.25 $mg l^{-1}$	3.15 ± 0.15	7.55 ± 0.55	23.38 ± 9.56	62.00 ± 11.61	128.37 ± 10.27	
	0.5 $mg l^{-1}$	2.95 ± 0.05	6.55 ± 0.25	15.75 ± 1.56	37.50 ± 1.80	62.25 ± 13.86	
	1 $mg l^{-1}$	2.65 ± 0.15	5.00 ± 0.80	13.50 ± 3.12	24.00 ± 3.00	59.75 ± 7.27	
	2.5 $mg l^{-1}$	N.D.	N.D.	N.D.	27.13 ± 6.05	55.63 ± 6.06	
	5 $mg l^{-1}$	N.D.	N.D.	N.D.	15.00 ± 6.42	38.75 ± 8.30	

		Concentración de Cobre				
B	Inóculo inicial	3	6	12	24	48
		Control = 0.01	= 0.025	> 0.05	= 0.1	= 0.25 = 0.5 = 1
		Control = 0.01	> 0.025	> 0.05	≥ 0.1	≥ 0.25 = 0.5 = 1
		Control < 0.01	= 0.025	> 0.05	> 0.1	> 0.25 = 0.5 = 1
		Control =	0.025	= 0.05	> 0.1	= 0.25 > 0.5 > 1 = 2.5 = 5
	Control >	0.025	= 0.05	> 0.1	> 0.25 > 0.5 = 1 = 2.5 = 5	

En los cultivos con una densidad celular inicial de 48×10^4 células ml^{-1} (Fig. 9), concentraciones de cobre iguales o inferiores a 0.10 mg l^{-1} producen densidades celulares máximas entre 189×10^4 células ml^{-1} y 162×10^4 células ml^{-1} en los cultivos con 0.05 y 0.10 mg l^{-1} de cobre, respectivamente; estas densidades difieren significativamente del valor obtenido en los cultivos control sin cobre (224.66×10^4 células ml^{-1}) (Tabla II). Los cultivos con 0.25 mg l^{-1} de cobre presentan una reducción del crecimiento de un 50% con respecto a la densidad celular a las 96 horas obtenida en los cultivos control sin cobre. Concentraciones de cobre iguales o superiores a 0.50 mg l^{-1} producen una drástica inhibición del crecimiento, alcanzando valores de densidad celular a las 96 horas entre 38.75×10^4 y 62.25×10^4 células ml^{-1} , en los cultivos con 3 y con 0.50 mg l^{-1} , respectivamente (Tabla II).

En la figura 10 se representan las tasas de crecimiento obtenidas en todos los cultivos realizados con diferentes concentraciones de cobre y diferentes densidades celulares iniciales y en la figura 11 se representan las tasas de crecimiento obtenidas con las concentraciones de cobre iguales o inferiores a 1 mg l^{-1} , que son las que se han utilizado con todas las densidades celulares. En estas figuras se observa que la tasa de crecimiento disminuye cuando la concentración de cobre de los cultivos aumenta, pero también disminuye, y en función de la densidad celular inicial del inóculo. No obstante, en los cultivos con densidades celulares iniciales de 3 y 6×10^4 células ml^{-1} no existen diferencias significativas entre las tasas de crecimiento para la misma concentración de cobre. En estos cultivos la tasa de crecimiento es 0 o negativa con concentraciones de cobre superiores a 0.25 mg l^{-1} ; esta tasa de crecimiento se reduce en un 50% a partir de los cultivos con 0.025 mg l^{-1} de cobre.

En los cultivos con una densidad celular inicial de 12×10^4 células ml^{-1} , la tasa de crecimiento es cero en los cultivos con 0.50 mg l^{-1} de cobre o concentraciones superiores (Fig. 10). Los cultivos con un inóculo inicial de 12×10^4 células ml^{-1} , presentan tasas de crecimiento similares a los cultivos con inóculos más altos cuando las concentraciones de cobre son inferiores a 0.25 mg l^{-1} , mientras que a concentraciones de cobre superiores los valores de las tasas de crecimiento son similares a los cultivos con inóculos bajos.

No existen diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de los cultivos con densidades celulares iniciales de 24 y 48×10^4 células ml^{-1} para cada una de las concentraciones de cobre ensayadas (Fig. 11), como sucedía en los cultivos con una densidad celular inicial de 3 y 6×10^4 células ml^{-1} . En los cultivos con un inóculo

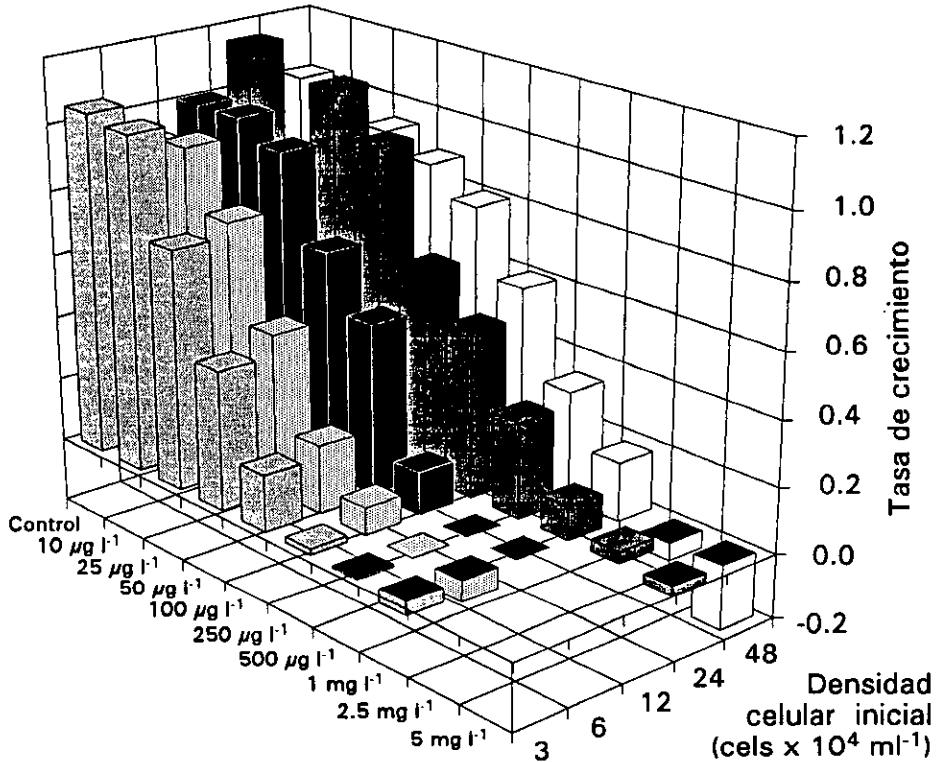


Figura 10.- Tasas de crecimiento (expresadas en doblajes día⁻¹) de los cultivos de *P. tricornutum* con diferentes concentraciones de cobre y distintas densidades celulares iniciales.

inicial de 24 y 48×10^4 células ml^{-1} , la tasa de crecimiento no se hace cero hasta concentraciones de cobre de 2.5 mg l^{-1} .

La manera más fácil de obtener el valor de la EC_{50} es mediante la interpolación gráfica; sin embargo, para obtener un intervalo de confianza es necesario la utilización de un método estadístico como es el análisis Probit. Los valores calculados de la EC_{50} a las 48 y 96 horas, para los cultivos con distintos inóculos se han representado en la figura 12. Los valores de la EC_{50} obtenidos para los cultivos con distintas densidades celulares iniciales a las 48 horas se ajustan a una recta (coeficiente de correlación de 0.99). A las 96 horas, los valores de EC_{50} que se obtienen para los distintos inóculos coinciden con los obtenidos para las 48 horas, con la única excepción de los cultivos con un inóculo de 48×10^4 células ml^{-1} , en los que la EC_{50} a las 48 horas es 0.542 mg l^{-1} de cobre, y a las 96 horas es 0.302 mg l^{-1} de cobre (Fig. 12).

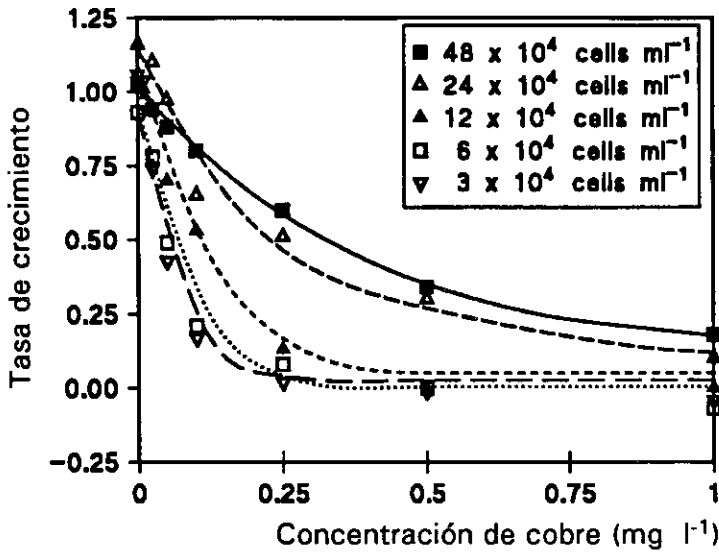


Figura 11.- Tasa de crecimiento de los cultivos (expresada en doblajes día⁻¹) de *P. tricornutum* con diferentes concentraciones de cobre (mg l⁻¹) y diferentes densidades celulares iniciales.

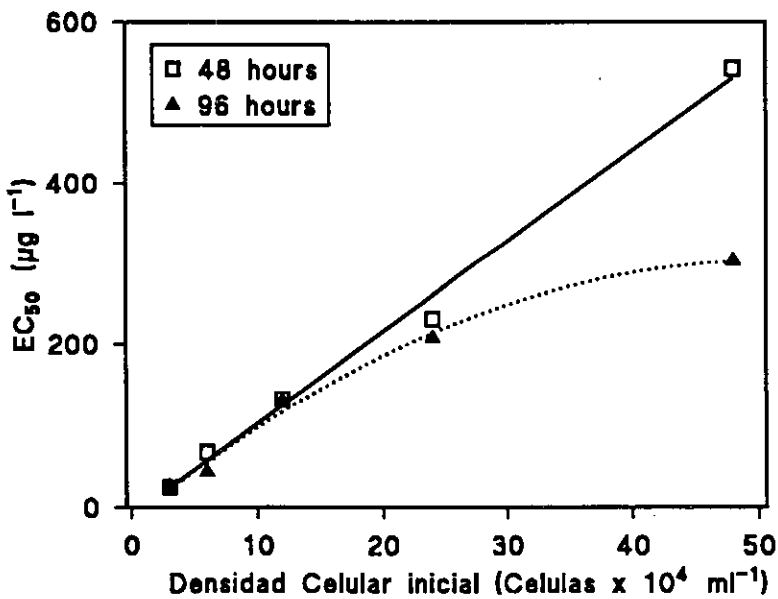


Figura 12.- Concentración efectiva (EC₅₀) (expresada en µg ml⁻¹ de cobre) de *Phaeodactylum tricornutum* con diferentes concentraciones de cobre y densidades celulares iniciales.

Tabla III.- Parámetros de la función logística de los cultivos de *P. tricornutum* con densidades iniciales de 24 y 48 x10⁴ células ml⁻¹. Se indican únicamente los cultivos cuyos valores se adaptan a dicha función.

[Cu]	Densidad celular inicial							
	48x10 ⁴ ml ⁻¹				24x10 ⁴ ml ⁻¹			
	K	B	z	r	k	B	z	r
0	226.80	4.25	1.31	0.99	157.40	7.67	1.59	0.99
0.025	189.80	3.99	1.62	0.98	142.30	11.62	1.80	0.99
0.05	198.60	4.37	1.36	0.99	147.00	6.85	1.29	0.99
0.1	174.60	3.57	1.31	0.98	76.62	2.41	1.03	0.99
0.25	137.60	2.13	1.00	0.99	68.53	1.95	0.74	1.00
0.5	60.36	0.27	1.03	0.94	36.50	0.53	0.75	0.85

El crecimiento de los cultivos con una densidad celular inicial de 24 y 48 x10⁴ células ml⁻¹, se ajusta a una función logística del crecimiento, a excepción de los cultivos con concentraciones de cobre iguales o superiores a 1 mg l⁻¹; mientras que en los cultivos con densidades celulares iniciales de 3, 6 y 12 x10⁴ células ml⁻¹, los crecimientos no se ajustan a una función logística, con excepción de los cultivos control, con 0.01 y con 0.025 mg l⁻¹ de cobre y una densidad celular inicial de 12 x10⁴ células ml⁻¹.

Los parámetros de la función logística a la que se ajustan los crecimientos de los cultivos con una densidad celular inicial de 24 y 48 x10⁴ células ml⁻¹ se muestran en la Tabla III. En esta tabla se puede observar como la capacidad de carga del medio (K) es dependiente de la concentración de metal del medio y de la densidad celular inicial de los cultivos. Así, la capacidad de carga de los cultivos control con una densidad celular inicial de 48 x10⁴ células ml⁻¹ es 226.80 x10⁴ células ml⁻¹, mientras que en los cultivos control con una densidad celular inicial de 24 x10⁴ células ml⁻¹ es 157.40 x10⁴ células ml⁻¹ (Tabla III). En ambos casos, la capacidad de carga de los cultivos control sin cobre es unas 4 veces la capacidad de carga de los cultivos con 0.5 mg l⁻¹ de cobre.

A la vista de los resultados de crecimiento obtenidos, se establece la densidad celular inicial de 24 x10⁴ células ml⁻¹ como la más adecuada para los restantes estudios

acerca de la toxicidad del cobre sobre diferentes parámetros fisiológicos de la diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum*.

EFECTO DE LA PRESENCIA DE COBRE EN EL MEDIO SOBRE LA INCORPORACIÓN DE ^3H -TIMIDINA POR *Phaeodactylum tricornutum*

Objetivo

La medida de la incorporación de timidina marcada radiactivamente se ha utilizado con el fin de determinar crecimiento bacteriano y fitoplanctónico (Tubbing & Admiraal, 1991a, b). Aunque este método ha sido descrito por los citados autores como uno de los más sensibles a la hora de determinar el efecto de diferentes contaminantes sobre poblaciones naturales de bacterias y fitoplancton, numerosos autores dudan de la efectividad del mismo como índice de crecimiento de microalgas y células eucariotas en general (Moriarty, 1984; Karl, 1986).

Puesto que en esta técnica se mide la incorporación de ^3H -timidina en la célula y el marcaje radiactivo puede producirse tanto en el ADN como en el ARN (por transformación de la timina en uracilo, a causa de la pérdida del grupo metilo de la timina), se propone la utilización de esta método como medida indirecta de la síntesis de ácidos nucleicos y, por tanto, como medida indirecta del crecimiento (Moriarty, 1984).

Diseño experimental

Para determinar la incorporación de ^3H -timidina se utilizan cultivos sincronizados y en fase exponencial de crecimiento con una densidad celular de 24×10^4 células ml^{-1} , a los que se adicionan las diferentes concentraciones de cobre, previamente establecidas: 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1, 2.5 y 5 mg l^{-1} de cobre, además de un control al que no se le adiciona cobre. Tras 12 horas de exposición al cobre en fase de luz, se adiciona la ^3H -timidina en fase de luz, inmediatamente antes de iniciarse la fase de oscuridad, y durante una hora, cada 15 minutos se realiza la recogida de muestras.

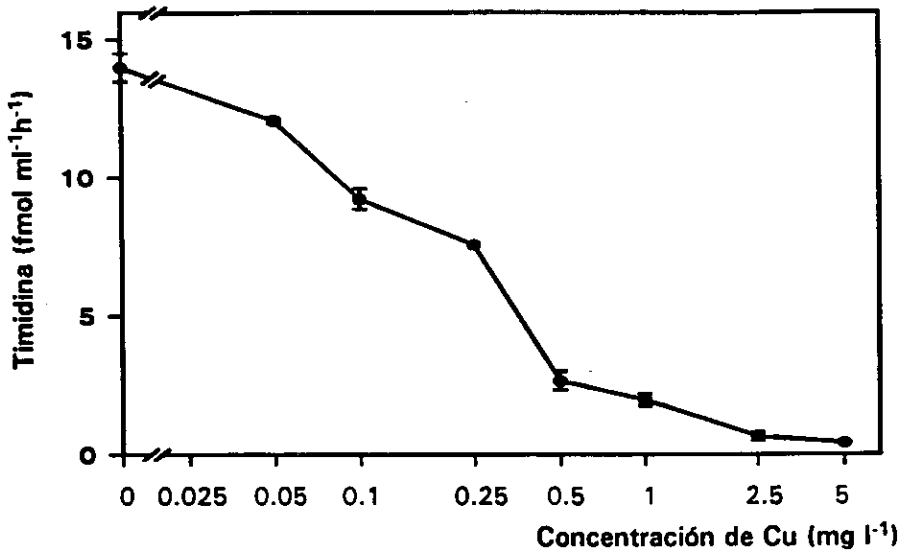


Figura 13.- Tasa de incorporación de ³H-timidina (expresada en fmol ml⁻¹ h⁻¹) por células de *Phaeodactylum tricornutum* después de 12 horas de exposición a diferentes concentraciones de cobre en el medio.

Resultados

La tasa de incorporación de timidina marcada radiactivamente es lineal durante la primera hora de incubación, de ahí que el estudio se haya llevado a cabo durante este período de tiempo.

La cantidad de timidina incorporada disminuye paulatinamente a medida que aumenta la concentración de cobre en el medio (Fig. 13). La menor concentración de cobre utilizada (0.05 mg l⁻¹) ya reduce aproximadamente un 15% la cantidad de timidina incorporada (12.07 fM ml⁻¹ h⁻¹) frente a los cultivos control sin cobre (14 fM ml⁻¹ h⁻¹) (Fig. 13).

En los cultivos con 0.5 y 1 mg l⁻¹ de cobre, la tasa de incorporación de ³H-timidina presenta valores de 2.669 y 1.978 fM ml⁻¹ h⁻¹, lo que representa un 19.06 y el 14.14% de la tasa que presentan las células cultivadas sin cobre, respectivamente. La incorporación de ³H-timidina es prácticamente nula en los cultivos con las concentraciones de cobre más elevadas, con valores de 0.657 y 0.415 fM ³H-timidina ml⁻¹ h⁻¹, en los cultivos con 2.5 y 5 mg l⁻¹ de cobre, respectivamente.

EFFECTO DEL COBRE SOBRE LA TASA DE FOTOSÍNTESIS DE LA MICROALGA MARINA *Phaeodactylum tricornutum*

Objetivo

La fotosíntesis es un buen sistema indicador de la toxicidad de metales pesados sobre microalgas marinas. Se ha demostrado que la acción tóxica de los metales sobre la fotosíntesis se ejerce a varios niveles: alteraciones cloroplásticas (Prevot & Soyer, 1979), alteración de los pigmentos fotosintéticos (Prevot & Soyer, 1979; Berland & Chretiennot, 1984) e interferencia con los procesos de transporte de electrones (Stauber y Florence, 1990).

Después de estudiar cómo afectan diferentes concentraciones de cobre al crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum*, analizamos el efecto de distintas concentraciones de cobre sobre la tasa de fotosíntesis mediante la técnica de incorporación de ^{14}C -bicarbonato.

Diseño experimental

Para determinar cómo afecta el cobre a la tasa de fotosíntesis de *P. tricornutum* se utilizan concentraciones de cobre de 0.025, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1, 2.5 y 5 mg l^{-1} , además de un cultivo control al que no se le adiciona cobre. Todos los cultivos se realizan por triplicado.

El inóculo se reparte en botellas PYREX de 500 ml con 250 ml de medio, a los que se adicionan alícuotas de la solución "stock" de cobre para obtener las concentraciones finales utilizadas. La densidad celular inicial es 24×10^4 células ml^{-1} . El isótopo, $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (Amersham, 674 mCi mg^{-1}), se adiciona al medio en fase de oscuridad, inmediatamente antes de comenzar el período de luz, obteniendo una actividad final en el cultivo de 0.1 $\mu\text{Ci ml}^{-1}$.

Los cultivos se incuban durante 8 horas en las condiciones de luz y temperatura señaladas en el apartado de "Materiales y Métodos". Las muestras se recogen de cada uno de los cultivos a intervalos de 1 hora y se procesan como se

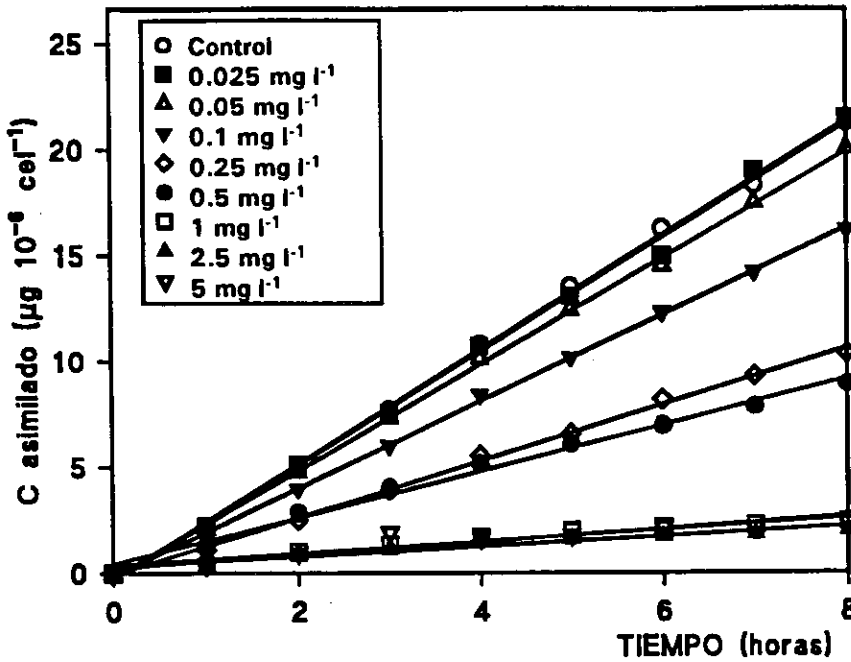


Figura 14.- Incorporación de carbono (expresado en $\mu\text{g } 10^{-6} \text{ célula}^{-1}$) por células de *P. tricornutum* cultivadas con distintas concentraciones de cobre en el medio.

describe en el apartado de "Materiales y Métodos". Los resultados se expresan en μg de carbono asimilado $10^{-6} \text{ células}^{-1}$ y la tasa de incorporación se expresa en μg de carbono asimilado $\text{l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Los datos obtenidos se analizan estadísticamente mediante un análisis de la varianza (ANOVA) ($P \leq 0.05$).

Resultados

En la figura 14 se representa la incorporación de carbono frente al tiempo en los cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* con diferentes concentraciones de cobre. Las cinéticas de incorporación se ajustan a ecuaciones lineales, con coeficientes de correlación (r) de 0.99, a excepción de los cultivos con 1 mg l^{-1} ($r=0.94$), 2.5 mg l^{-1} ($r=0.91$) y 5 mg l^{-1} de cobre ($r=0.84$). La pendiente de estas rectas disminuye a medida que aumenta la concentración de cobre en el medio, lo que indica una inhibición del proceso de asimilación de ^{14}C -bicarbonato (Fig. 14).

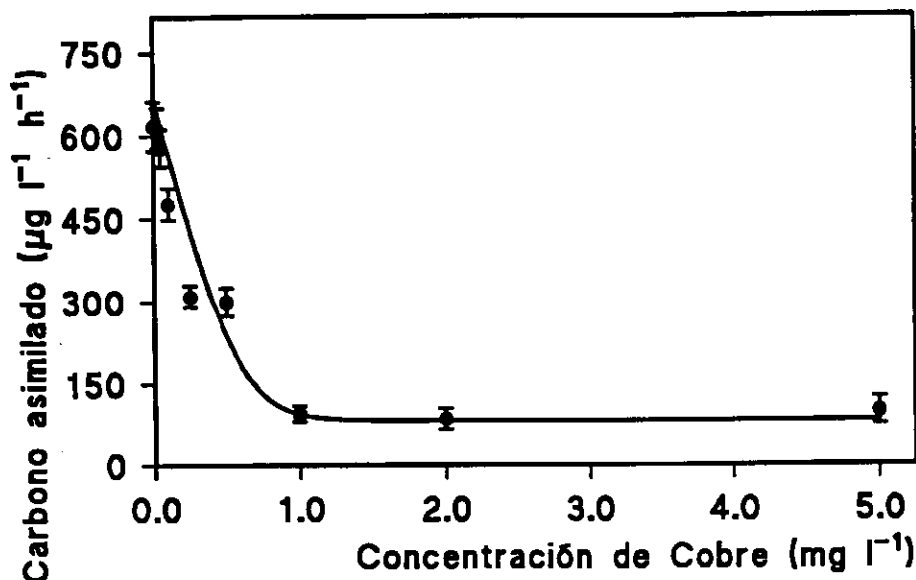


Figura 15.- Tasa de incorporación de carbono (expresado en $\mu\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$) por células de *P. tricornutum* cultivadas con distintas concentraciones de cobre en el medio.

Las menores concentraciones de cobre ensayadas (0.025 y 0.05 mg l^{-1}) no afectan a la cantidad de carbono asimilado (Fig. 14). A las 8 horas de luz se obtienen valores de carbono asimilado de 21.27 , 21.47 y $19.99 \mu\text{g}$ de carbono por millón de células en los cultivos control y con 0.025 y 0.05 mg l^{-1} de cobre, respectivamente. Concentraciones de cobre superiores o iguales a 0.10 mg l^{-1} producen un efecto inhibitorio sobre la incorporación de carbono marcado radiactivamente (Fig. 14). Los cultivos con 0.25 y 0.50 mg l^{-1} de cobre presentan una notable inhibición de la fotosíntesis, con valores de 10.37 y $8.92 \mu\text{g}$ carbono $10^6 \text{ células}^{-1}$, valores significativamente diferentes al que presentan los cultivos control. La cantidad de carbono marcado asimilado es prácticamente nula a lo largo del período de tiempo ensayado cuando las concentraciones de cobre son superiores a 1 mg l^{-1} , obteniéndose valores de 2.45 , 2.02 y 2.46 para los cultivos de 1 , 2.5 y 5 mg l^{-1} , respectivamente.

La tasa de fotosíntesis, expresada en μg de carbono asimilado por litro de cultivo y hora (Fig. 15 y Tabla IV), se calcula a partir del carbono asimilado a lo largo del ensayo. En la figura 15 se observa un descenso de la tasa de fotosíntesis

Tabla IV. - Tasa de incorporación de carbono por células de *P. tricornutum* cultivadas con distintas concentraciones de cobre en el medio y relación respecto al control.

Tasa de fotosíntesis		
[Cu]	($\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	%
Control	617.81 \pm 43.98	100
0.025 mg l⁻¹	614.31 \pm 36.69	99.43
0.05 mg l⁻¹	578.60 \pm 33.82	93.65
0.1 mg l⁻¹	477.31 \pm 28.89	77.26
0.25 mg l⁻¹	310.21 \pm 20.08	50.27
0.5 mg l⁻¹	300.21 \pm 25.60	48.59
1 mg l⁻¹	94.28 \pm 14.69	15.26
2.5 mg l⁻¹	85.37 \pm 19.38	13.82
5 mg l⁻¹	98.68 \pm 25.41	15.97
EC₅₀	0.405 mg l⁻¹	

cuando aumenta la concentración de cobre en el medio. A partir de 0.05 mg l⁻¹ de cobre se produce un descenso acusado de la tasa de fotosíntesis, que cae bruscamente a concentraciones de cobre iguales o superiores a 1 mg l⁻¹. En estos cultivos con concentraciones de cobre iguales o superiores a 1 mg l⁻¹, la tasa de fotosíntesis no supera el 16% de la que se observa en los cultivos control sin cobre. La reducción del 50% de la tasa de fotosíntesis (EC₅₀) se obtiene con 0.405 mg l⁻¹ de cobre (Tabla IV).

EFFECTO DEL COBRE SOBRE EL CONTENIDO CELULAR DE ATP EN *Phaeodactylum tricornutum*

Objetivo

Cuando el cobre consigue llegar en exceso al interior de una célula y los mecanismos de detoxificación son incapaces de amortiguar esta entrada, puede ejercer una toxicidad a diferentes niveles celulares. En esta experiencia se analiza el efecto que tienen diferentes concentraciones de cobre en el medio sobre la producción de ATP en la microalga marina *P. tricornutum*.

Diseño experimental

Se disponen cultivos de *P. tricornutum* con una densidad celular inicial de 24×10^4 células ml^{-1} diferentes concentraciones de cobre en un rango de 0.025 a 5 mg l^{-1} . Cada concentración se realiza por triplicado, frente a un control sin adición de metal que se realiza también por triplicado. Los cultivos se preparan durante la fase de oscuridad y una vez distribuidos se colocan en la cámara de cultivo con luz. Transcurridas 8 horas de exposición a la luz y al metal, se toma una alícuota (20 ml) de cada cultivo y se procesa para la medición del ATP, tras su extracción de las células, por el método de la luciferina-luciferasa, como se describe en el apartado de "Materiales y métodos".

Resultados

Los resultados obtenidos en el presente estudio, indican que después de 8 horas de exposición a la luz y al metal la concentración intracelular de ATP disminuye a medida que aumenta la concentración de cobre en el medio (Fig. 16). En los cultivos control, a los que no se les adiciona cobre, la concentración intracelular de ATP es de $0.060 \text{ nmol ATP } 10^{-6} \text{ célula}^{-1}$; este valor decae paulatinamente a medida que aumenta la concentración de cobre alcanzando un valor de $0.004 \text{ nmol ATP } 10^{-6} \text{ célula}^{-1}$ en los cultivos con una concentración de cobre de 0.1 mg l^{-1} , es decir, se produce una reducción aproximadamente del 93%. Los

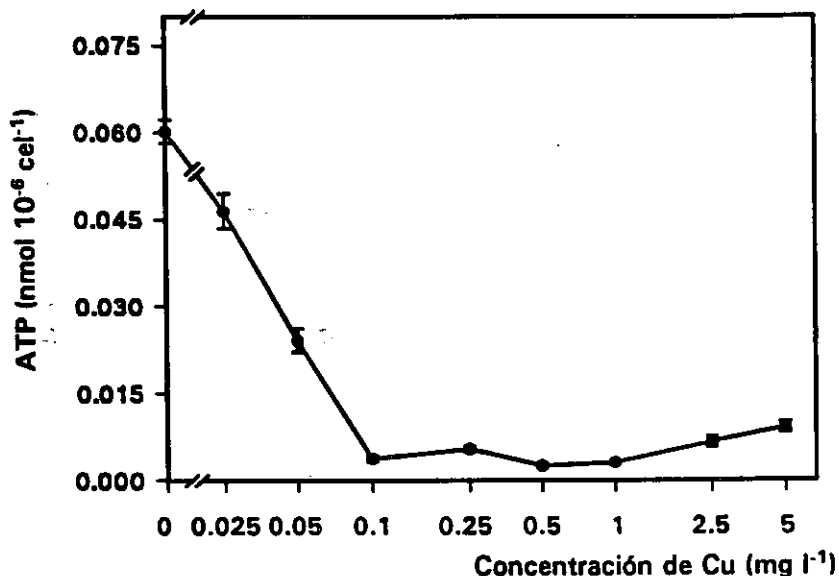


Figura 16.- Contenido celular de ATP (expresado en nmol 10⁻⁶ célula⁻¹) de células de *P. tricornutum* cultivada en presencia de distintas concentraciones de cobre en el medio.

cultivos con concentraciones de cobre superiores a 0.1 mg l⁻¹ no presentan una concentración intracelular de ATP significativamente diferente a la de los cultivos con esta concentración de cobre (Fig. 16).

EFECTO DEL COBRE SOBRE LA COMPOSICIÓN RELATIVA DE LOS PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS DE *Phaeodactylum tricornutum*

Objetivo

Anteriormente se ha descrito que diferentes concentraciones de cobre inhiben la fotosíntesis de la diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum*. Algunos autores han propuesto que el efecto tóxico del cobre y otros metales pesados sobre la fotosíntesis puede deberse en parte a la interacción del metal con los pigmentos fotosintéticos, bien a nivel de su propia estructura, en su biosíntesis, etc. (Lustigman, 1986).

Con el análisis de pigmentos de *P. tricornutum* por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), estudiamos el efecto del cobre sobre el patrón de pigmentos de esta diatomea expuesta a diferentes concentraciones de este metal.

Diseño experimental

Para estudiar el patrón de pigmentos de *P. tricornutum* se utiliza la técnica de HPLC, siguiendo el método de Wright *et al.* (1991), como se ha descrito en el apartado de "Materiales y Métodos".

Las concentraciones de cobre utilizadas en esta experiencia han sido 0.05, 0.10, 0.25, 0.50 y 1 mg l⁻¹ de cobre, además de un cultivo control al que no se le adiciona cobre. La densidad celular inicial de los cultivos es 24×10^4 células ml⁻¹, como se ha establecido previamente, y los pigmentos se analizan a las 24 horas de exposición al cobre.

Resultados

Los resultados obtenidos muestran que el cobre afecta al patrón de pigmentos de *P. tricornutum* a determinadas concentraciones, después de 24 horas de exposición al metal.

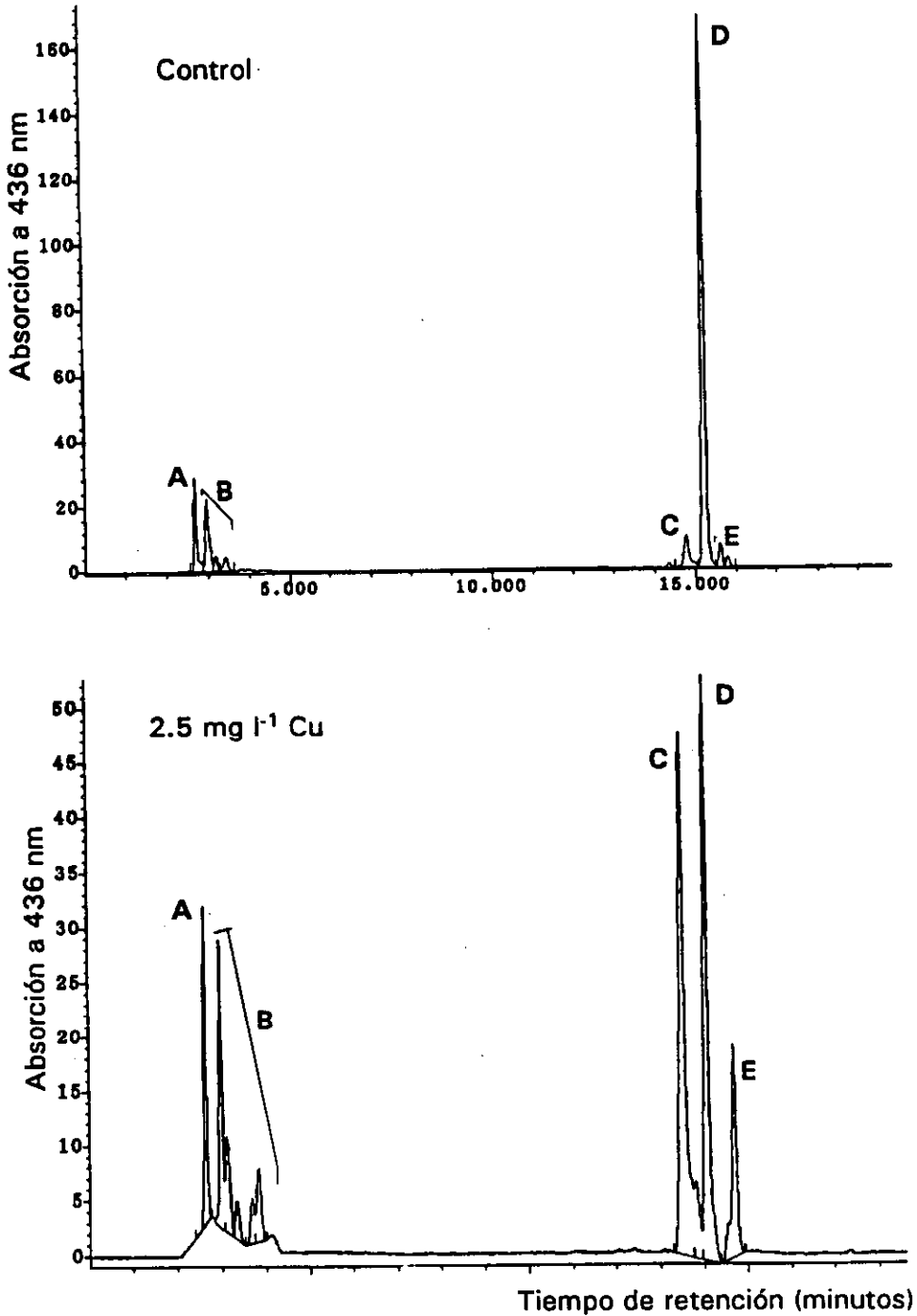


Figura 17.- Cromatogramas de los pigmentos de las células de *P. tricornutum* cultivadas sin cobre (control) y con 2.5 mg l⁻¹ de cobre en el medio. A: Clorofilas c₁+c₂; B: xantofilas; C: Alómero de la clorofila a; D: Clorofila a; E: β-caroteno

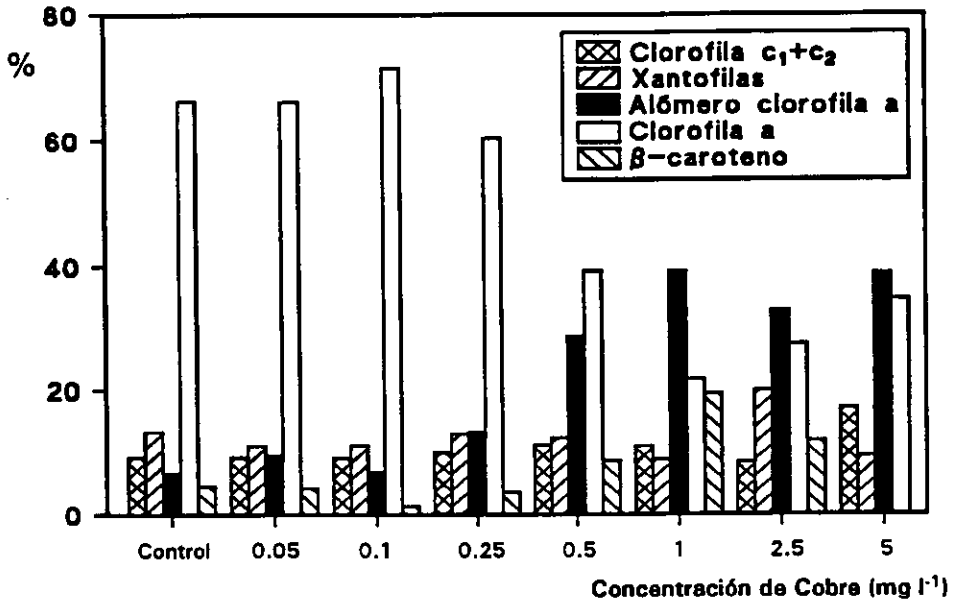


Figura 18.- Porcentaje de cada grupo de pigmentos fotosintético sobre el total de pigmentos de las células de *P. tricornutum* cultivada con distintas concentraciones de cobre en el medio.

El patrón de pigmentos de *P. tricornutum* utilizado como modelo es el propuesto por Wright *et al.* (1991). En los cromatogramas obtenidos se resuelven varios pigmentos, que se eluyen de la columna cromatográfica en el siguiente orden: clorofila c₁+c₂, xantofilas, alómero de la clorofila a, clorofila a y β-caroteno (Fig. 17). Dentro de las xantofilas se agrupan varios pigmentos que son: fucoxantina, cis-fucoxantina, diadinoxantina, diadinoxantina, diadinoxantina, diadinoxantina, diadinoxantina, diadinoxantina, diadinoxantina, diadinoxantina. Si comparamos los cromatogramas que se obtienen en las células cultivadas sin cobre y en las cultivadas con 2.5 mg l⁻¹ de cobre, se observa claramente el cambio en el patrón de pigmentos que se produce por efecto del metal. En el control la clorofila a es el pigmento predominante (pico D) con una enorme diferencia frente a los demás, mientras que en los cultivos con 2.5 mg l⁻¹ de cobre, las diferencias entre pigmentos se suavizan (Fig. 17).

En la figura 18 se representan cada uno de los pigmentos resueltos por HPLC, expresados como porcentaje de cada uno de ellos frente al total de los

pigmentos obtenidos. Este porcentaje se calcula a partir del área correspondiente al pico que de cada uno de ellos aparece en los diferentes cromatogramas. La proporción de clorofilas *c* permanece relativamente constante con las diferentes concentraciones de cobre añadidas al medio, con excepción de los cultivos con 5 mg l⁻¹ de cobre, en los que las clorofilas *c* representan el 17.07% de los pigmentos totales, mientras que en los restantes cultivos este porcentaje varía entre 8.37 y 11.17% (Fig. 18).

Las proporciones de xantofilas son muy similares en todos los cultivos y constituyen aproximadamente el 10% del total de pigmentos, salvo en los cultivos con 2.5 mg l⁻¹ de cobre, en los que las xantofilas representan el 19.82% del total de pigmentos (Fig. 18).

La proporción de β-caroteno es 4.51% para los cultivos control y 4.14% para los cultivos con 0.05 mg l⁻¹ de cobre (Fig. 18); esta proporción disminuye en los cultivos con 0.10 y 0.25 mg l⁻¹ de cobre, para volver a aumentar en los cultivos con concentraciones iguales o superiores a 0.50 mg l⁻¹, siendo máxima en los cultivos con 1 mg l⁻¹ (19.32 % del total de pigmentos). En los cultivos con 5 mg l⁻¹ de cobre ha sido imposible la integración del pico correspondiente al β-caroteno.

Sin embargo, los cambios más importantes se observan en las proporciones que presentan tanto la clorofila *a* como su alómero (Fig. 18). La proporción del alómero de la clorofila *a* con respecto al total de los pigmentos analizados aumenta a medida que se incrementa la concentración de cobre en el medio, si bien no existen diferencias significativas entre el control y los cultivos con 0.05 y 0.10 mg l⁻¹ de cobre. En los cultivos control la proporción de este alómero es 6.77%, mientras que en los cultivos con la concentración de cobre más alta de las ensayadas, 5 mg l⁻¹, es 39.02%. Mientras la proporción del alómero aumenta, la de clorofila *a* disminuye; en los cultivos control y con una concentración de cobre igual o menor a 0.25 mg l⁻¹, esta proporción oscila entre 60.33 y 71.55% (Fig. 18). Cuando la concentración de cobre es igual o superior a 0.5 mg l⁻¹, la proporción de clorofila *a* se reduce, siendo mínima con 1 mg l⁻¹ de cobre.

Existe una correlación negativa entre la proporción de la clorofila *a* y su alómero para las concentraciones de cobre ensayadas, con un coeficiente de

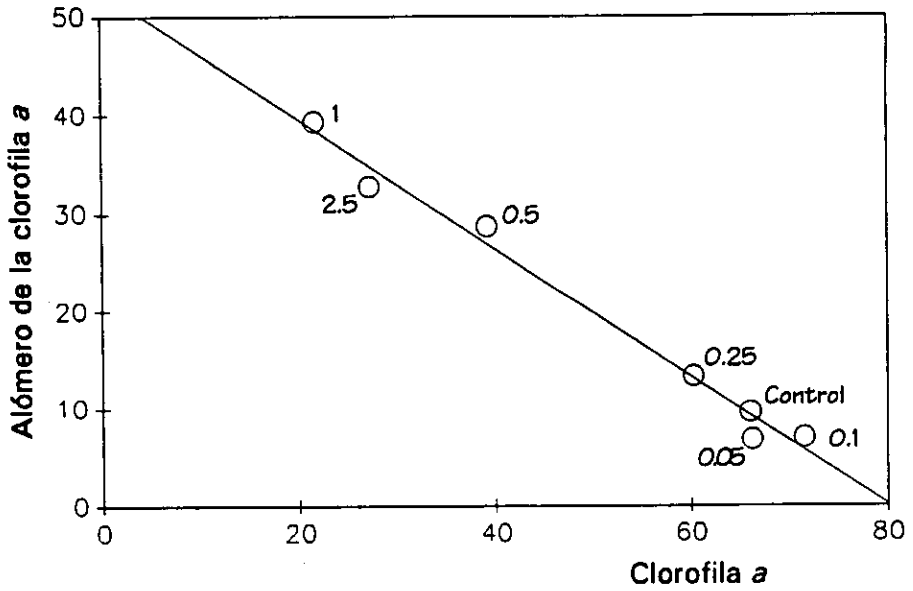


Figura 19.- Relación entre la clorofila a y el alómero de la clorofila a (expresada en %) en los cultivos de *P. tricornutum* con distintas concentraciones de cobre en el medio.

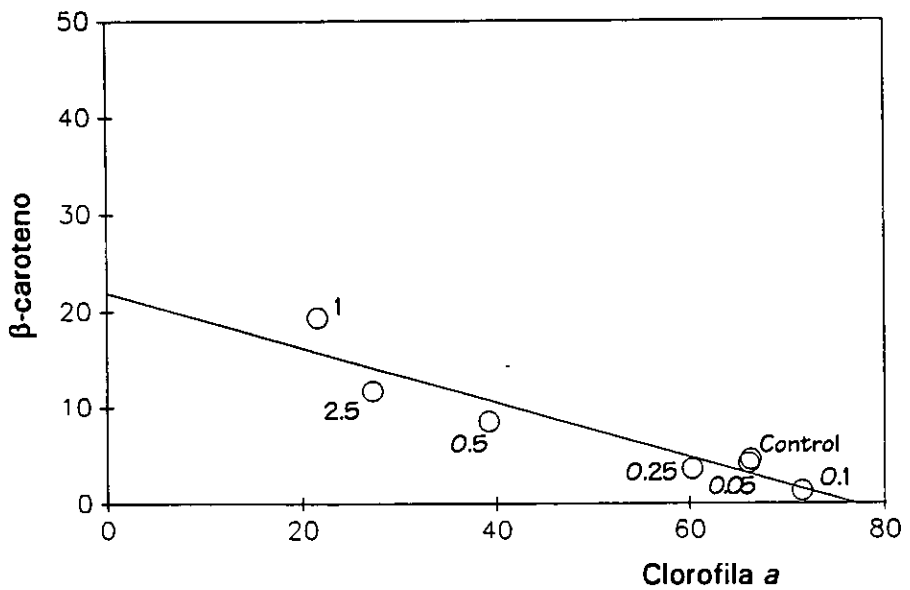


Figura 20.- Relación entre la clorofila a y el β-caroteno (expresada en %) en los cultivos de *P. tricornutum* con distintas concentraciones de cobre en el medio.

correlación (r) de 0.99 (Fig. 19). Una correlación similar se encuentra entre la proporción de clorofila *a* y la de β -caroteno, ya que a medida que la concentración de cobre aumenta el porcentaje de clorofila *a* disminuye, mientras que la proporción de β -caroteno aumenta ($r=0.94$) (Fig. 20). En ambos casos se pueden observar dos grupos de cultivos (Figs. 19 y 20):

- un grupo de cultivos no afectados, con relaciones netre los pigmentos similares a las de los cultivos control, que incluye los cultivos con concentraciones de cobre menores o iguales a 0.10 mg l^{-1} ,
- un segundo grupo de cultivos afectados, que incluye aquellos cultivos con concetraciones de cobre iguales o superiores a 0.5 mg l^{-1} , con relaciones entre los pigmentos significativamente diferentes a los de los cultivos control.

Los cultivos con 0.25 mg l^{-1} de cobre presentan una posición intermedia entre ambos grupos.

EFFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE COBRE SOBRE EL VOLUMEN Y GRANULARIDAD CELULAR DE *Phaeodactylum tricornutum*

Objetivo

Los efectos tóxicos que elevadas concentraciones de cobre en el agua de mar pueden producir en la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum* incluyen cambios morfológicos celulares.

Mediante la técnica de citometría de flujo se ha estudiado la respuesta morfológica de *P. tricornutum* frente a diferentes concentraciones de cobre. Los parámetros estudiados han sido el volumen o tamaño celular, que viene dado por el FSC, y la granularidad o complejidad celular, medida que es proporcionada por el SSC. La luz refractada ("light scattering") no se entiende como una fluorescencia, pero es de gran utilidad en todos los estudios de CMF, ya que permite la diferenciación de subpoblaciones celulares sin necesidad de tinciones específicas.

Las alteraciones producidas en el volumen celular se han estudiado tanto inmediatamente después de la adición de diferentes concentraciones de cobre al agua de mar, como a lo largo del crecimiento celular en cultivos con diferentes concentraciones de cobre.

Diseño experimental

Para el estudio del efecto inmediato del cobre sobre el volumen celular se utilizan cultivos de *P. tricornutum* con una densidad celular de 24×10^4 células ml^{-1} , de los que se analizan alícuotas de 1 ml de cultivo, que se pasan a tubos de poliestireno utilizados para CMF. De estas alícuotas se adquieren al menos 1300 células antes de la adición del cobre, que serán utilizadas como control de cada una de las muestras. Después de adquirido el control, a cada una de las muestras se les añade la cantidad necesaria de una solución "stock" concentrada de cloruro de cobre para alcanzar una concentración final en la muestra de 2.5, 5, 10 y 20 mg l^{-1} de cobre, además de un blanco al que no se le adiciona cobre alguno, que servirá de referencia para asegurar que el efecto observado se debe únicamente a la

adición del metal y no a la técnica utilizada. Estas concentraciones de cobre tan elevadas (10 y 20 mg l⁻¹ de cobre) se utilizan para obtener una respuesta celular importante frente al metal de forma inmediata.

Para el estudio de los posibles cambios morfológicos de la diatomea *P. tricornutum* a lo largo del tiempo se utilizan cultivos con una densidad celular inicial de 24 x 10⁴ células ml⁻¹, a los que se les adicionan las diferentes concentraciones de cobre, previamente establecidas: 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1, 2.5 y 5 mg l⁻¹ de cobre, además de un control al que no se le adiciona cobre. Las muestras, alícuotas de 1 ml de cultivo, se recogen a las 8, 24, 48, 72 y 96 horas de la adición del cobre para ser analizadas en el citómetro de flujo.

Resultados

La adición de elevadas concentraciones de cobre a los cultivos produce un aumento inmediato del volumen celular de la microalga marina *P. tricornutum*. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 24. Los histogramas (Fig. 24) muestran que las células de *P. tricornutum* expuestas a 2.5 y 5 mg l⁻¹ de cobre no sufren cambios significativos en su volumen celular, mientras que en los cultivos a los que se les adicionan 10 y 20 mg l⁻¹ de cobre presentan un aumento inmediato del volumen celular.

En la tabla V se muestran los resultados del análisis estadístico de cada uno de los histogramas representados en la figura 21, correspondientes a la variación del volumen celular de *P. tricornutum* con diferentes concentraciones de cobre. En dicha tabla se observa como el canal de la media de los cultivos con 20 mg l⁻¹ de cobre es el doble del control. En los cultivos con 5 y 2.5 mg l⁻¹ de cobre apenas existen diferencias entre la media del control y la media de los cultivos después de ser añadido el cobre.

En los estudios a lo largo del tiempo, se observa que el volumen de las células de *P. tricornutum* aumenta tras la exposición a concentraciones de cobre de 1, 2.5 y 5 mg l⁻¹ durante las 96 horas de cultivo. En la figura 22 se representan los datos del cambio producido en el volumen celular a lo largo del tiempo de

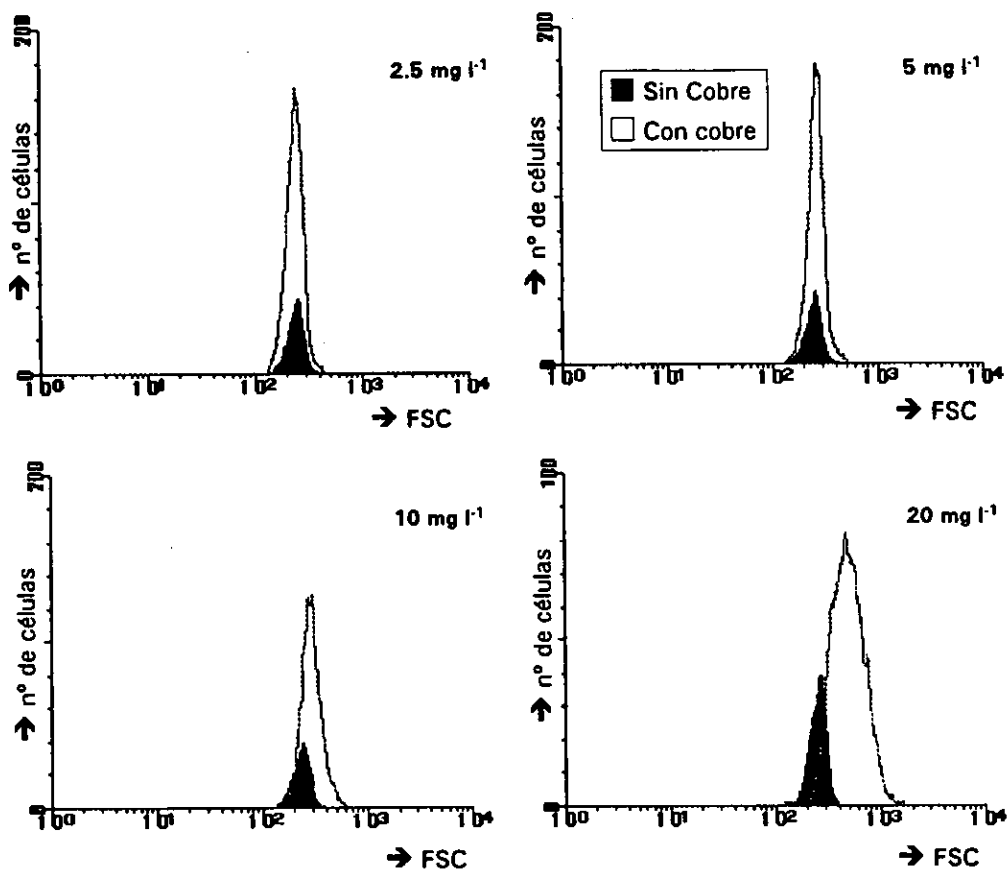


Figura 21.- Histogramas de la respuesta del volumen celular de *Phaeodactylum tricornutum* a la adición de cobre. En el eje de las X se representa el volumen expresado en canales y en el eje de las Y el número de células pertenecientes a cada uno de dichos canales.

Tabla V.- Tamaño medio (expresado en números canales) de las células de *P. tricornutum* antes e inmediatamente después de la adición de distintas concentraciones de cobre (expresada en mg l^{-1}) al medio

[Cu]	Tamaño medio		
	Antes (Sin Cu)	Después (Con Cu)	% incremento
0	243.43 ± 46.46	-	-
2.5	237.22 ± 41.30	235.78 ± 47.50	99.39
5	245.20 ± 46.44	261.41 ± 55.57	106.61
10	230.19 ± 42.35	288.71 ± 84.77	125.42
20	247.73 ± 46.65	507.93 ± 192.05	205.03

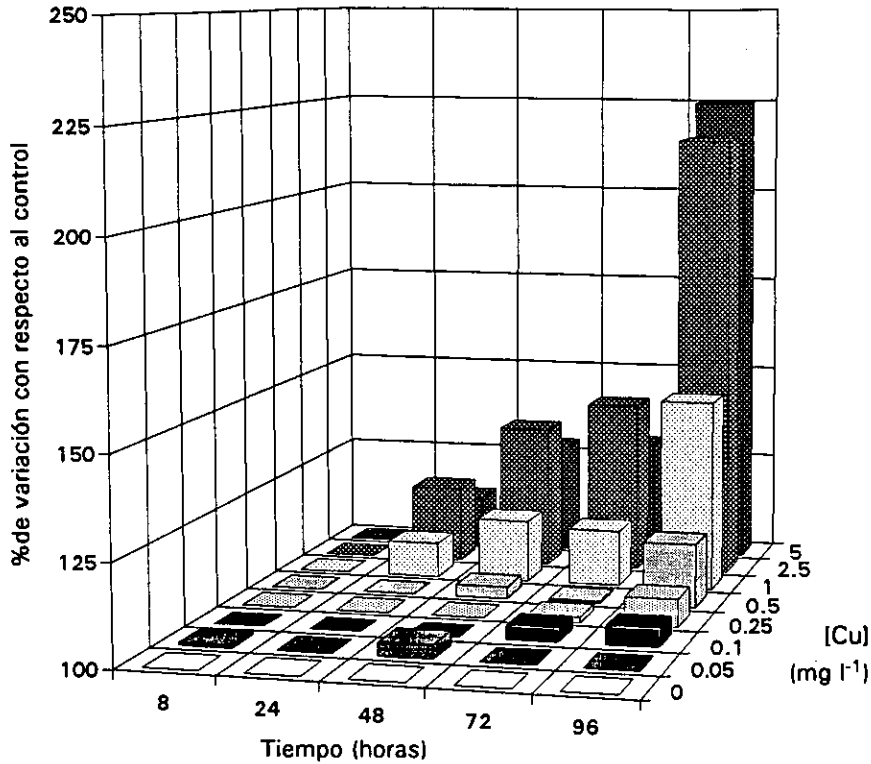


Figura 22.-Variación del tamaño celular de *Phaeodactylum tricornutum* analizado por citometría de flujo, en cultivos con diferentes concentraciones de cobre a lo largo de las 96 horas de exposición al metal. Los datos se expresan en porcentaje de variación del tamaño celular con respecto al tamaño de las células del cultivo control sin cobre (0). Las unidades de tamaño utilizadas son números canales.

cultivo expresados como porcentaje del volumen de las células control (sin cobre) de acuerdo con la ecuación descrita por Reader *et al.* (1993):

$$\%V = 100 - [100(V_{\text{control}} - V_{\text{cobre}}) / V_{\text{control}}]$$

dónde %V es el porcentaje de variación del volumen de las células problema; V_{control} es el volumen medio de las células del control, expresado en canales; y V_{cobre} es el volumen medio de las células tratadas con cobre.

A las ocho horas de la adición del cobre no existen cambios significativos en el tamaño de las células analizadas (Fig. 22). Después de 24 horas de la adición del cobre, los cultivos con 2.5 y 5 mg l⁻¹ presentan un ligero aumento de su

volumen celular, con respecto al volumen celular que se observa en los cultivos control, con un 20 y un 13% de aumento, respectivamente. La mayor diferencia de volumen se observa al cabo de 96 horas de exposición al cobre en los cultivos con 2.5 y 5 mg l⁻¹, con un porcentaje de aumento de 116% para los cultivos con 2.5 mg l⁻¹ y de 125% para los cultivos con 5 mg l⁻¹, lo que significa que el volumen es doble, mientras que los cultivos con 1 mg l⁻¹ presentan un porcentaje de aumento del tamaño celular con respecto al control de sólo un 49%. Los restantes cultivos no presentan cambios significativos en su volumen celular con respecto a los cultivos control, a lo largo de las 96 horas de cultivo (Fig. 22).

En las figuras 23 y 24 se representados los diagramas (denominados "scattergramas", ya que la señal recogida es la luz refractada por la propia célula a su paso frente al haz de luz) de tamaño frente a complejidad (FSCxSSC) obtenidos a las 8 horas (Fig. 23) y a las 96 horas (Fig. 24) con las diferentes concentraciones de cobre. Se observa que a medida que aumenta el volumen celular a lo largo del tiempo, también aumenta la complejidad celular. Las diferencias de volumen y complejidad celular son máximas a las 96 horas de exposición a 5 mg l⁻¹ de cobre. En esta representación es posible reconocer 2 subpoblaciones a las 96 horas de exposición al cobre en los cultivos con 2.5 y 5 mg l⁻¹ de cobre:

- a) una primera subpoblación que comprende el 36.20% de las células analizadas de los cultivos con 2.5 mg l⁻¹ y el 39.44% de las de los cultivos con 5 mg l⁻¹ de cobre, y con un tamaño igual al de las células del control, y
- b) una subpoblación de células de mayor tamaño que el control, que incluye el 63.80% de las células analizadas de los cultivos con 2.5 mg l⁻¹ de cobre y el 60.56% de las analizadas en los cultivos con 5 mg l⁻¹ de cobre.

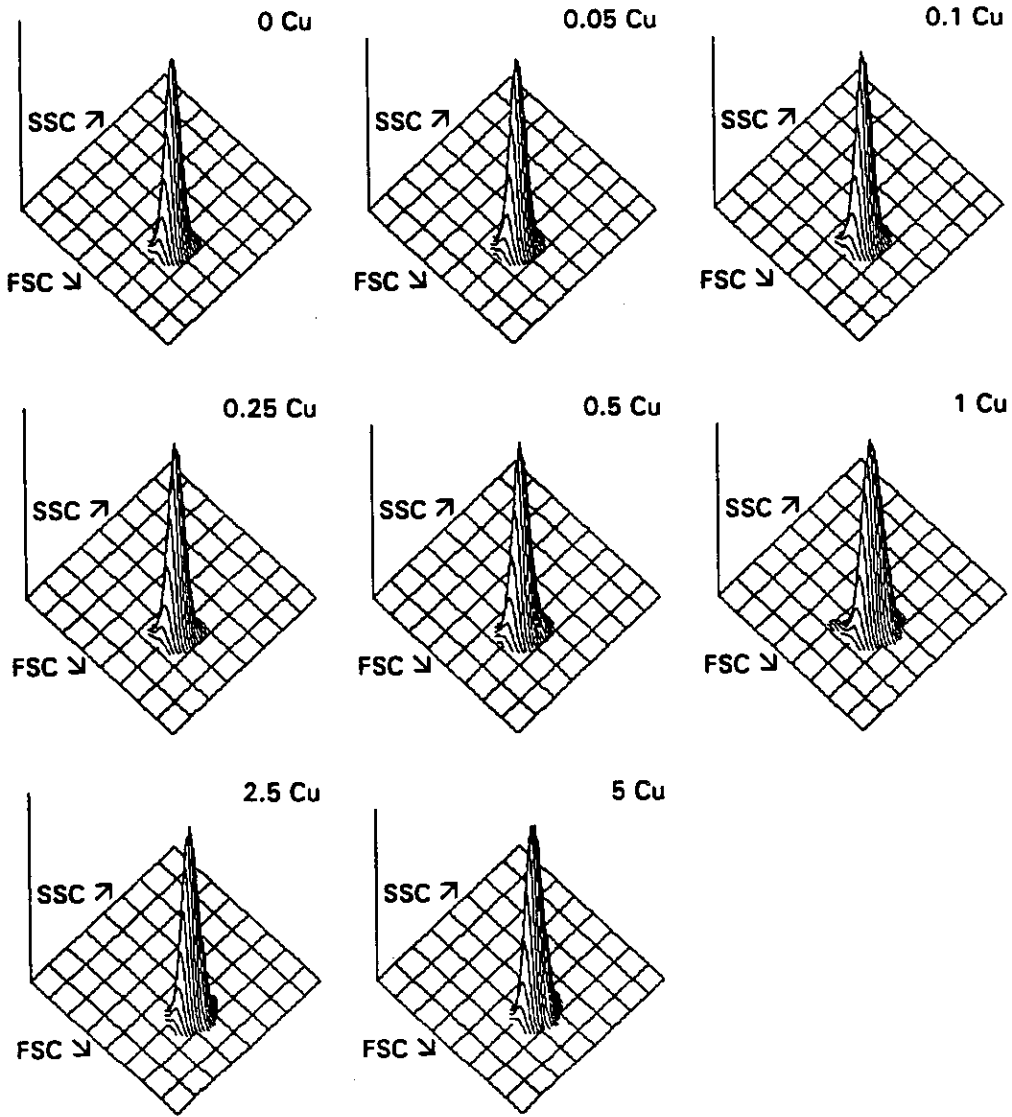


Figura 23.- Evolución del volumen y la granularidad de las células de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivos con diferentes concentraciones de cobre, a las 8 horas de exposición al metal. En el eje X se representa el volumen celular (FSC), en el Y se representa el número de células y en el eje Z la granularidad celular (SSC).

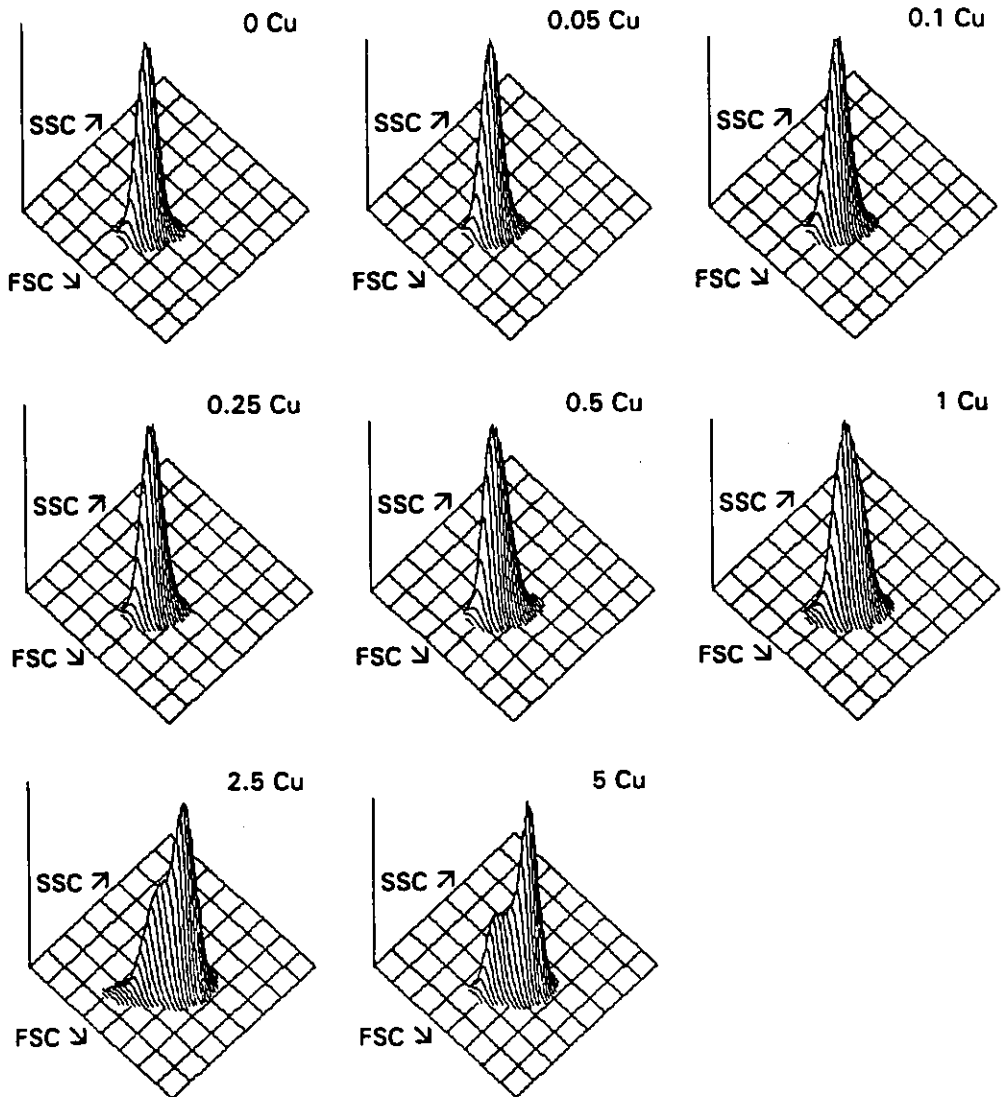


Figura 24.- Evolución del volumen y la granularidad de las células de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivos con diferentes concentraciones de cobre, a las 96 horas de exposición al metal. En el eje X se representa el volumen celular (FSC), en el Y se representa el número de células y en el eje Z la granularidad celular (SSC).

ESTUDIO DE LA AUTOFLUORESCENCIA CELULAR EN CULTIVOS DE *Phaeodactylum tricornutum* EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COBRE

Objetivo

Las microalgas presentan una fuerte fluorescencia natural procedente de los pigmentos fotosintéticos y accesorios. Esta característica las convierte en un tipo de células fácilmente identificables por citometría de flujo. En el presente estudio el término autofluorescencia hace referencia a la fluorescencia emitida por la clorofila *a*, cuyo espectro de emisión se encuentra por encima de los 660 nm, y se detecta en la FL3 del citómetro de flujo utilizado.

Diseño experimental

Para el estudio de la evolución de la fluorescencia de la clorofila *a* de la diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum* a lo largo del tiempo se utilizan cultivos con una densidad celular inicial de 24×10^4 células ml^{-1} , a los que se les adicionan las diferentes concentraciones de cobre, previamente establecidas: 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1, 2.5 y 5 mg l^{-1} de cobre, además de un control al que no se le adiciona cobre alguno. Se recogen alícuotas de 1 ml de cultivo a las 8, 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo, que son analizadas en el citómetro de flujo.

Resultados

En la figura 25 se representan los datos del cambio observado en la autofluorescencia celular a lo largo del tiempo de cultivo, expresados como porcentaje de la autofluorescencia de las células control (sin cobre) de acuerdo con la ecuación descrita por Reader *et al.* (1993) y utilizada previamente para el volumen celular:

$$\%F = 100 - [100(F_{\text{control}} - F_{\text{cobre}}) / F_{\text{control}}]$$

dónde %F es el porcentaje de variación de la autofluorescencia de las células problema; F_{control} es la autofluorescencia media de las células del control, expresado en canales; y F_{cobre} es autofluorescencia media de las células tratadas con cobre.

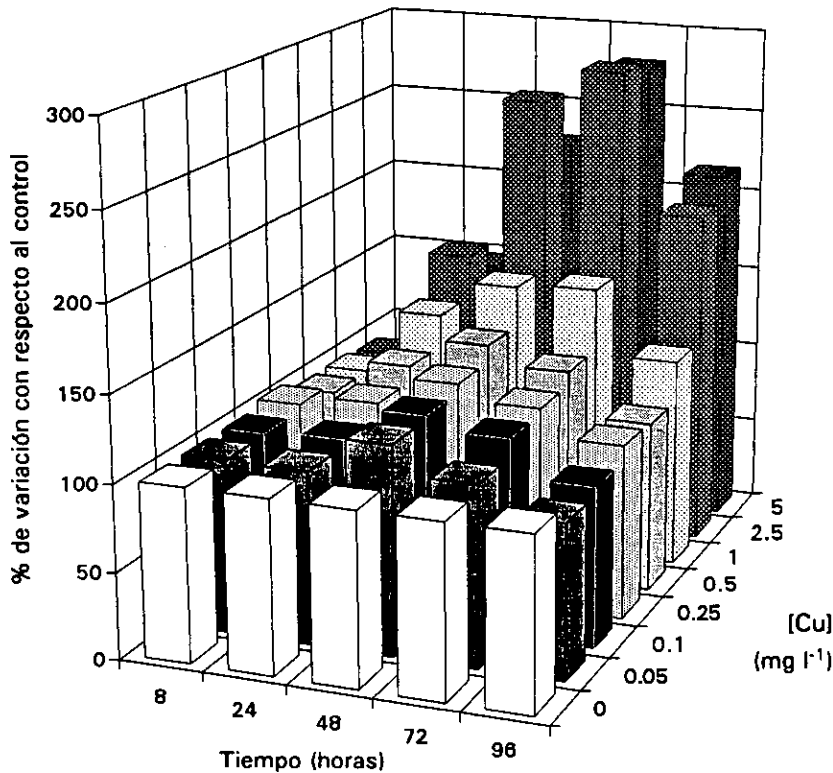


Figura 25.- Variación de la autofluorescencia de las células de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivos con diferentes concentraciones de cobre a lo largo de 96 horas de exposición al metal, analizada por citometría de flujo. Los datos se expresan en porcentaje de variación de la autofluorescencia celular con respecto a la autofluorescencia de las células del cultivo control sin cobre (0). Las unidades de autofluorescencia utilizadas son números canales.

La autofluorescencia media de las células de *P. tricornutum* varía a lo largo del cultivo con diferentes concentraciones de cobre (Fig. 25). A las 8 horas de exposición al cobre no existen diferencias en cuanto a la autofluorescencia emitida por las células, si bien los cultivos con 5 mg l⁻¹ de cobre presentan un porcentaje de fluorescencia menor. Los cultivos con 2.5 mg l⁻¹ de cobre presentan el mayor porcentaje de fluorescencia respecto al control a las 24, 48 y 72 horas de cultivo. A las 72 horas, los cultivos con 2.5 y 5 mg l⁻¹ de cobre presentan la mayor diferencia de la autofluorescencia, con un 185% y 179% más que los cultivos control (Fig. 25). Al cabo de 96 horas de cultivo, la autofluorescencia de los cultivos con 0.05 y 0.10 mg l⁻¹ de cobre es ligeramente menor que la de los cultivos control; en los restantes

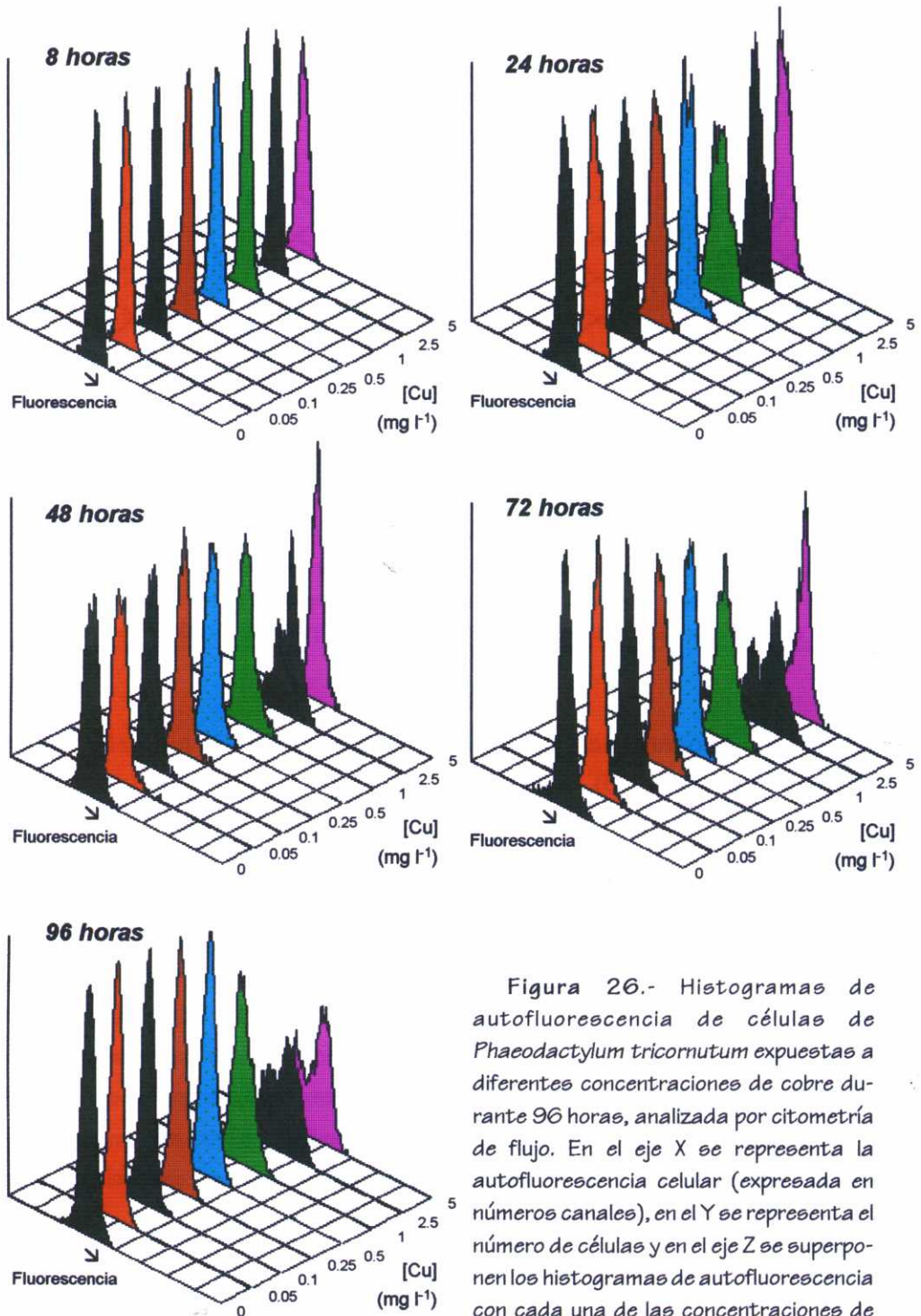


Figura 26.- Histogramas de autofluorescencia de células de *Phaeodactylum tricornutum* expuestas a diferentes concentraciones de cobre durante 96 horas, analizada por citometría de flujo. En el eje X se representa la autofluorescencia celular (expresada en números canales), en el Y se representa el número de células y en el eje Z se superponen los histogramas de autofluorescencia con cada una de las concentraciones de cobre ensayadas.

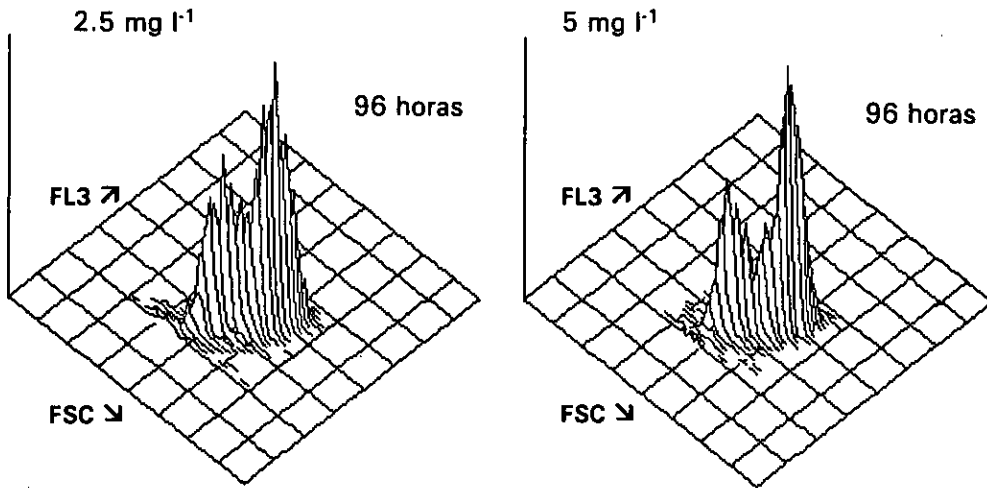


Figura 27.- Diagramas de volumen celular frente a la autofluorescencia de las células de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivos con 2.5 y 5 mg l⁻¹ de cobre, a las 96 horas de exposición al metal, analizados por citometría de flujo. En el eje X se representa la volumen celular (FSC, expresado en números canales), en el Y se representa el número de células y en el eje Z se representa de autofluorescencia (FL3, expresado en números canales).

cultivos la autofluorescencia aumenta proporcionalmente a la concentración de cobre en el medio (Fig. 25).

En la figura 26 se representan los histogramas correspondientes a la distribución de la autofluorescencia en los diferentes canales de los cultivos de *P. tricornutum* con distintas concentraciones de cobre, además del control. El desplazamiento de la población a lo largo del eje x, muestra la aparición de 2 subpoblaciones. En la figura 27 se representa el tamaño celular frente a la autofluorescencia a las 96 horas de exposición al cobre; en esta representación se observa la aparición de 2 grupos de células diferentes, caracterizados en función de su autofluorescencia y de su volumen celular en los cultivos con una concentración de cobre de 2.5 y 5 mg l⁻¹ de cobre. Estas dos subpoblaciones celulares ya se pueden observar a las 72 horas de exposición al cobre.

El "software" utilizado para el análisis de datos obtenidos por citometría de flujo nos permite asegurar que el grupo de células que presentan una mayor autofluorescencia, se corresponde con el grupo de células de mayor tamaño, que se ha descrito en el apartado anterior de estos resultados.

ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR EN CULTIVOS DE *Phaeodactylum tricornutum* EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COBRE

Objetivo

Los microorganismos son generalmente los primeros en ser afectados por las descargas de metales pesados en su ecosistema, ya que están directamente en contacto con el medio, separados únicamente por una membrana y, en ocasiones, por una pared celular (Wood, 1989). Aunque la pared celular puede adsorber metales de forma pasiva, la integridad de la membrana plasmática puede ser destruida por un exceso de metal (Tarchevskii *et al.*, 1982), pero, aunque no llegue a verse dañada, siempre sufre cambios cuando se altera el medio que la circunda.

El yoduro de propidio (IP) es un fluorocromo que atraviesa la membrana de las células cuando éstas no son viables y presentan alteraciones en su membrana plasmática; basándose en esta propiedad se analiza la viabilidad de las células de *P. tricornutum* como respuesta a la presencia de cobre en el medio.

Diseño experimental

Mediante la técnica de citometría de flujo se estudia la viabilidad de las células de *Phaeodactylum tricornutum* expuestas a diferentes concentraciones de cobre a lo largo del crecimiento de la población.

La viabilidad celular se analiza a lo largo de 96 horas en cultivos de *P. tricornutum* con una densidad celular inicial de 24×10^4 células ml^{-1} . Las concentraciones de cobre utilizadas han sido las establecidas previamente: 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1, 2.5 y 5 mg l^{-1} , además de un control al que no se le adiciona cobre. Diariamente se toman 3 alícuotas de 250 μl de cada uno de los cultivos, se tiñen con yoduro de propidio, como se describe en el apartado de "Materiales y Métodos", y se analizan en el citómetro de flujo.

Tabla VI. Porcentaje de células viables (no teñidas con yoduro de propidio) de *Phaeodactylum tricornutum* durante el tiempo de exposición a diferentes concentraciones de cobre (expresadas en mg l^{-1}), con respecto al total de células analizadas por citometría de flujo.

[Cu]	Tiempo (horas)				
	4	24	48	72	96
0	98	97	97	99	95
0.05	98	99	99	98	99
0.1	99	99	98	98	99
0.25	99	99	98	98	99
0.5	100	99	98	99	98
1	100	99	97	98	76
2.5	100	99	73	59	14
5	100	97	65	23	8

Resultados

El porcentaje de células viables en los cultivos con concentraciones de cobre iguales o superiores a 1 mg l^{-1} desciende a lo largo de las 96 horas de exposición al cobre (Tabla VI). En los restantes cultivos, incluidos los cultivos control, el porcentaje de células viables se mantiene en torno al 98% del total de células analizadas, durante las 96 horas de cultivo (Tabla VI).

En los cultivos con 1 mg l^{-1} de cobre, durante las primeras 72 horas de cultivo la proporción de células viables varía entre el 100% y el 97%, a las 4 y 72 horas de adición del metal, respectivamente; sin embargo, después de 96 horas de exposición al metal esta proporción cae hasta el 76% de las células analizadas (Tabla VI).

En los cultivos con 2.5 y 5 mg l^{-1} de cobre aparecen células no viables a partir de las 48 horas de exposición al cobre (Tabla VI). A las 48 horas de cultivo la proporción de células viables es 73 y 65% en los cultivos con 2.5 y 5 mg l^{-1} de cobre, respectivamente; esta proporción desciende a lo largo del tiempo, de forma que a las 96 horas de adición de estas concentraciones de cobre, la mayoría de las

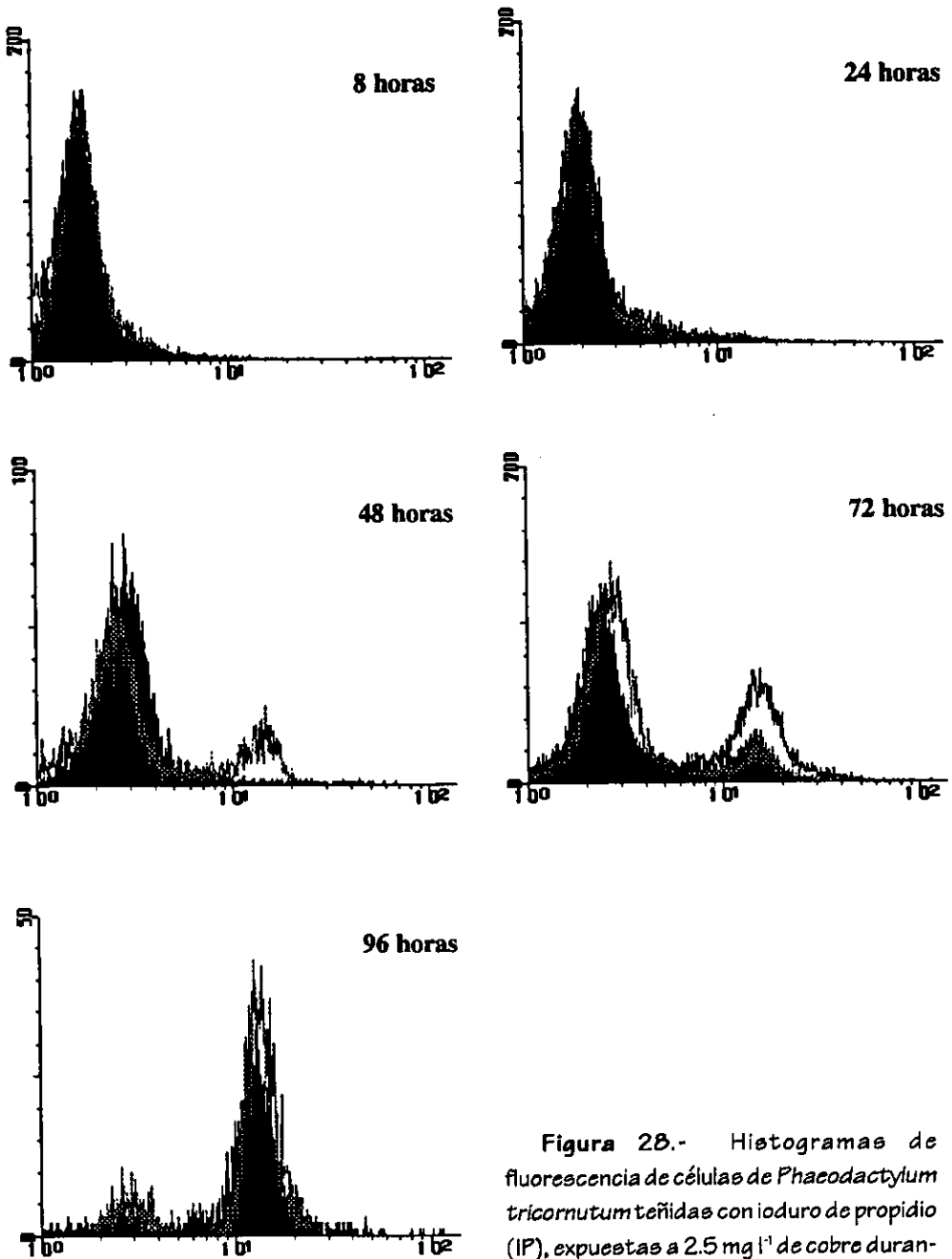


Figura 28.- Histogramas de fluorescencia de células de *Phaeodactylum tricornutum* teñidas con ioduro de propidio (IP), expuestas a 2.5 mg l^{-1} de cobre durante 96 horas, analizada por citometría de flujo. En el eje X se representa la

fluorescencia de las células (expresada en números canales) y en el Y se representa el número de células. Las células con una fluorescencia entre 10^0 y 10^1 canales se consideran viables (no teñidas con IP), mientras que las células con una fluorescencia superior a 10^1 canales se consideran no viables (teñidas con IP).

células de *P. tricornutum* presentan daños en su membrana plasmática, siendo la proporción de células viables 14 y 8%, respectivamente (Tabla VI).

En la figura 28 se representan los histogramas de fluorescencia de las células correspondientes a los cultivos con 2.5 mg l^{-1} de cobre, teñidas con yoduro de propidio, durante las 96 horas de exposición al cobre, ya que esta concentración es la menor de las utilizadas que presenta un efecto tóxico claro del cobre sobre la integridad de la membrana plasmática desde las 48 horas de exposición al metal. En esta figura se observa la evolución de la viabilidad en la población de células analizadas; a las 4 horas de adición de cobre prácticamente el 100% de las células analizadas no se tiñen con el yoduro de propidio, mientras que al cabo de 96 horas de exposición al metal sólo el 14% de la población presenta la membrana intacta y no se tiñe.

ACTIVIDAD PEROXIDASA EN CELULAS DE *Phaeodactylum tricornutum* SOMETIDAS A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE COBRE

Objetivo

La actividad peroxidasa se considera indispensable para el correcto funcionamiento celular; mediante esta actividad enzimática se elimina de las células buena parte del peróxido de hidrógeno que se forma al final de la cadena de transporte electrónico fotosintético. Determinados sustratos fluorogénicos de las peroxidases, como la hidroetidina (HE) son convertidos enzimáticamente en productos altamente fluorescentes en presencia de peróxido de hidrógeno (Watson *et al.*, 1990). En función de esto, analizamos el efecto del cobre sobre la actividad peroxidasa en células de *Phaeodactylum tricornutum*.

Diseño experimental

La respuesta de la actividad peroxidasa en células de *Phaeodactylum tricornutum* expuestas a diferentes concentraciones de cobre se analiza a lo largo de 96 horas de cultivo por citometría de flujo, utilizando el fluorocromo hidroetidina (HE) como sustrato de enzimas peroxidases.

El diseño experimental es el mismo que se ha descrito en los apartados anteriores referentes a análisis llevados a cabo por CMF. Se utilizan cultivos con una densidad celular inicial de 24×10^4 células ml^{-1} , a los que se les adicionan las diferentes concentraciones de cobre, previamente establecidas: 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1, 2.5 y 5 mg l^{-1} , además de un control al que no se le adiciona cobre. Diariamente y de cada uno de los cultivos se toman 3 alícuotas de 250 μl para ser teñidas con hidroetidina tal y como se describe en el apartado de "Materiales y Métodos" y se analizan en el citómetro de flujo.

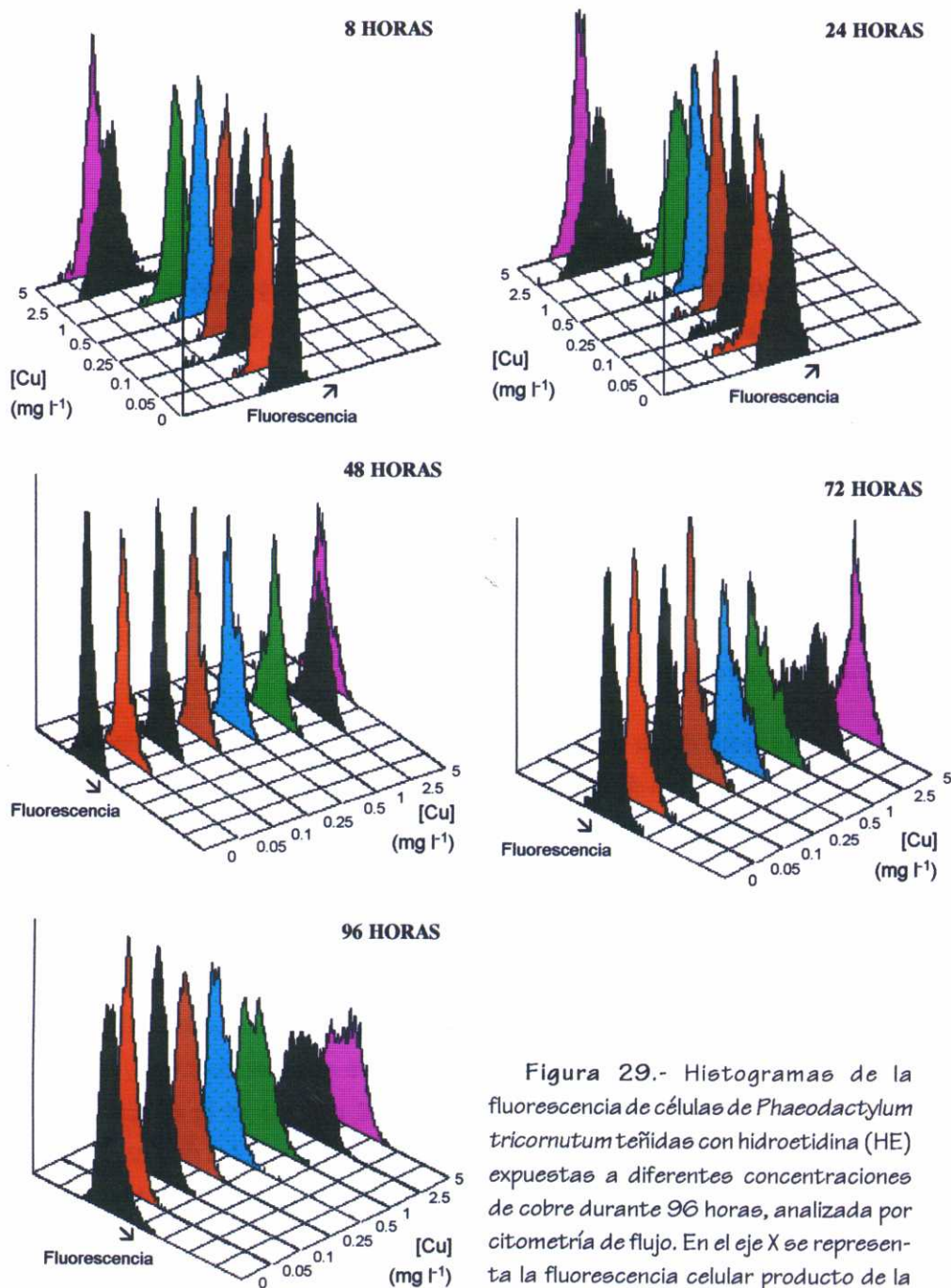


Figura 29.- Histogramas de la fluorescencia de células de *Phaeodactylum tricornutum* teñidas con hidroetidina (HE) expuestas a diferentes concentraciones de cobre durante 96 horas, analizada por citometría de flujo. En el eje X se representa la fluorescencia celular producto de la escisión de la HE por la actividad peroxidasa

de las células (expresada en números canales), en el Y se representa el número de células y en el eje Z se superponen los histogramas de autofluorescencia con cada una de las concentraciones de cobre ensayadas.

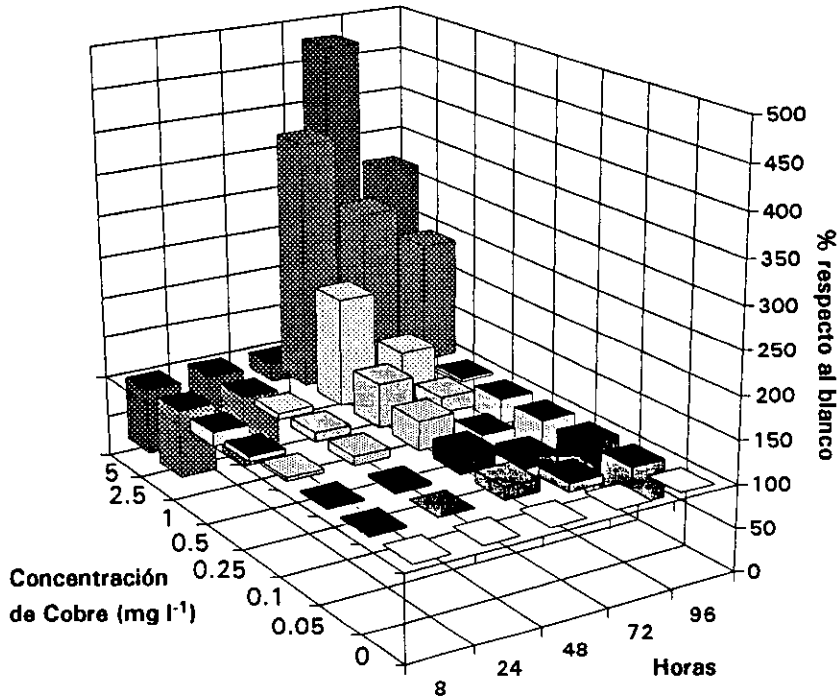


Figura 30.- Variación de la actividad peroxidasa de las células de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivos con diferentes concentraciones de cobre a lo largo de las 96 horas de exposición al metal, analizada por citometría de flujo. Los datos se expresan en porcentaje de variación de la fluorescencia celular debida a la tinción con hidroetidina (HE) con respecto a la fluorescencia que presentan las células del cultivo control, sin cobre (0). Las unidades de fluorescencia utilizadas son números canales.

Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 29 y 30. En la figura 29 se representan los histogramas de la fluorescencia de la HE obtenidos a lo largo del tiempo y con las diferentes concentraciones de cobre. El desplazamiento del histograma a lo largo del eje X indica cambios en la actividad peroxidasa celular por efecto de las diferentes concentraciones de cobre. Después de 72 horas de exposición al cobre los cultivos con concentraciones iguales o superiores a 0.5 mg l^{-1} presentan mayor actividad peroxidasa.

En la figura 30 se representan los datos del cambio observado en la actividad peroxidasa durante las 96 horas de cultivo, expresados como porcentaje de la fluorescencia de las células control (sin cobre) de acuerdo con la ecuación descrita por Reader *et al.* (1993). Las células cultivadas con 2.5 y 5 mg l⁻¹ de cobre presentan una actividad peroxidasa aproximadamente un 20% menor que las de los cultivos control, tanto a las 8 como a las 24 horas de cultivo. A las 48 horas de exposición al cobre, las células presentan una mayor actividad peroxidasa que la observada en las células del control, aumentando el porcentaje de actividad a medida que aumenta la concentración de cobre, a excepción de las células cultivadas con 5 mg l⁻¹ de cobre, que presentan una actividad peroxidasa a las 48 horas menor a la de las células control. Transcurridas 72 horas de exposición al cobre, la actividad peroxidasa en las células de los cultivos con 0.05, 0.10, 0.25 y 0.50 mg l⁻¹ de cobre es prácticamente igual a la de las células control, sin cobre; sin embargo, en los restantes cultivos la actividad peroxidasa es mayor que en el control, incluido el cultivo con 5 mg l⁻¹ de cobre, cuyas células presentan la mayor actividad peroxidasa. A las 96 horas de exposición al metal, sólo las células de los cultivos con 2.5 y 5 mg l⁻¹ de cobre presentan una actividad peroxidasa superior a la del control.

EFFECTOS DEL COBRE SOBRE LOS POTENCIALES DE MEMBRANA CITOPLASMÁTICA Y MITOCONDRIAL DE *Phaeodactylum tricornutum*

Objetivo

Los cambios en el potencial de membrana citoplasmática y mitocondrial pueden ocurrir durante los primeros instantes de procesos de activación mediados por receptores de superficie, y se piensa que juegan un importante papel en la transducción de señales entre la superficie celular y el interior. Las investigaciones en este área han mejorado por el desarrollo de métodos de estimación por CMF del potencial de membrana en células individuales, dado que la distribución de algunos fluorocromos refleja la diferencia de potencial eléctrico a través de membranas (Shapiro, 1990).

El potencial de membrana puede estimarse mediante la distribución de indicadores catiónicos lipofílicos o de fluorocromos específicos entre las células y el medio de suspensión. Una vez que las células han sido equilibradas con colorantes catiónicos, la despolarización eléctrica de las células (un descenso del potencial de membrana) causará una salida de colorante de las células hacia el medio, mientras que una hiperpolarización (un aumento en el potencial de membrana) hará que las células asimilen colorante adicional del medio.

Diseño experimental

Mediante la técnica de citometría de flujo se estudia la respuesta del potencial de membrana citoplasmática de células de *Phaeodactylum tricornutum* expuestas a diferentes concentraciones de cobre. Las alteraciones producidas en este potencial de membrana se estudian tanto inmediatamente después de la adición de diferentes concentraciones de cobre al cultivo, como a lo largo del crecimiento celular con diferentes concentraciones de cobre.

Para el estudio del efecto inmediato del cobre sobre el potencial de membrana citoplasmático se utilizan cultivos de *P. tricornutum* con una densidad celular de 24×10^4 células ml^{-1} , de los que se toman alícuotas de 1 ml de cultivo,

que se pasan a tubos de poliestireno para ser teñidas con el fluorocromo 3.3'-dihexyloxacarbocianina ($\text{DiOC}_6(3)$) tal y como se describe en el apartado de "Materiales y Métodos". De estas alícuotas se adquieren 5000 células, que serán utilizadas como control de cada una de las muestras y que nos permiten comprobar que se ha alcanzado el equilibrio entre la entrada y salida de fluorocromo (fluorescencia estable). Después de alcanzado el equilibrio y adquirido el control, a cada una de las muestras se le añade la cantidad necesaria de una solución "stock" concentrada de cloruro de cobre para alcanzar una concentración final en la muestra de 2.5, 5, 10 y 20 mg l^{-1} de cobre, además de un blanco al que no se le adiciona cobre alguno, que servirá de referencia para asegurar que el efecto observado se debe únicamente a la adición del metal y no a la técnica utilizada. Como en el caso del estudio del volumen celular, estas concentraciones de cobre tan elevadas (10 y 20 mg l^{-1} de cobre) se utilizan para obtener de forma inmediata una respuesta celular importante frente al metal. La distribución del colorante no representa fielmente el nuevo valor de potencial hasta que el equilibrio se alcance de nuevo (Shapiro, 1990); en el presente estudio, este proceso requiere un tiempo entre 30 segundos y 1 minuto, de modo que la medida se realiza pasado este minuto.

El potencial de membrana citoplasmático también se analiza en los cultivos de la diatomea *P. tricornutum* a lo largo de 96 horas. El diseño experimental es el mismo que se ha utilizado previamente para el estudio del volumen, complejidad celular y autofluorescencia. Se utilizan cultivos con una densidad celular inicial de 24×10^4 células ml^{-1} , a los que se adicionan las diferentes concentraciones de cobre, previamente establecidas: 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1, 2.5 y 5 mg l^{-1} , además de un control al que no se le adiciona cobre. Diariamente y de cada uno de los cultivos se toman 3 alícuotas de 250 μl para teñirlas con $\text{DiOC}_6(3)$, como se describe en el apartado de "Materiales y Métodos", y se analizan en el citómetro de flujo.

Para el estudio del potencial mitocondrial se ha utilizado el fluorocromo rodamina 123 (R 123), que es específico para mitocondrias. Dado que esta tinción es bastante problemática y más lenta que la anterior, se optó por estudiar únicamente el potencial de membrana mitocondrial después de las 24 y las 96 horas de exposición al cobre. De cada uno de los cultivos con las diferentes

Tabla VII.- Potencial de membrana citoplasmático medio determinado por la fluorescencia del fluorocromo DiOC₆(3) (expresado en números canales) de las células de *Phaeodactylum tricornutum* antes e inmediatamente después de la adición de diferentes concentraciones de cobre (expresadas en mg l⁻¹) al medio.

[Cu]	Antes(sin cobre)	Después(con cobre)	% respecto control
2.5	8.12 ± 4.99	13.00 ± 9.32	158.92
5	7.63 ± 4.87	14.29 ± 10.53	187.29
10	8.58 ± 5.20	20.27 ± 15.26	236.25
20	8.42 ± 5.67	23.02 ± 15.86	273.40

concentraciones de cobre, se toman 3 alícuotas de 250 µl para teñirlas con la rodamina 123, como se describe en el apartado de "Materiales y Métodos", y se analizan en el citómetro de flujo.

Resultados

La adición de las concentraciones de cobre ensayadas a los cultivos producen una hiperpolarización de la membrana, que viene dada por un aumento inmediato del potencial de membrana citoplasmático de la microalga marina *P. tricornutum*. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 31. Los histogramas muestran que las células de *P. tricornutum* expuestas a 2.5 y 5 mg l⁻¹ de cobre presentan un menor aumento del potencial de membrana, mientras que en los cultivos a los que se les adicionan 10 y 20 mg l⁻¹ de cobre se produce un importante aumento del potencial de membrana de las células de forma inmediata.

En la tabla VII se muestran los resultados del análisis estadístico, calculado por el "software" del que dispone el citómetro, de cada uno de los histogramas representados en la figura 31, correspondientes al potencial de membrana citoplasmático de *P. tricornutum* con diferentes concentraciones de cobre.

En la figura 32 se representan los datos del cambio observado en el potencial de membrana citoplasmático a las 24 y a las 96 horas de cultivo, expresados como porcentaje de la fluorescencia de las células control (sin cobre) de acuerdo con la ecuación descrita por Reader *et al.* (1993) y utilizada previamen-

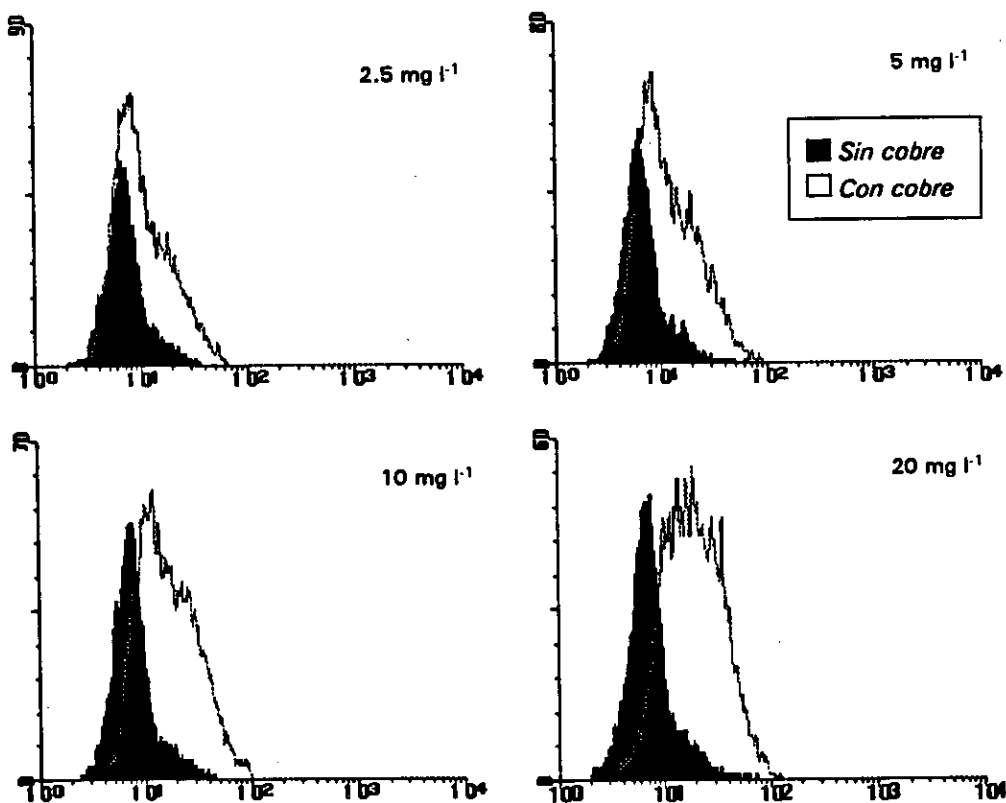


Figura 31.- Histogramas de la fluorescencia emitida por el fluorocromo DiOC₆(3) que reflejan los cambios del potencial de membrana citoplasmática (eje x) en células de *Phaeodactylum tricornutum* inmediatamente después de la adición de diferentes concentraciones de cobre al medio. En el eje y se representa el número de células correspondiente a cada uno de los canales de fluorescencia.

te. A las 24 horas de la adición del cobre, el potencial transmembrana de las células de *P. tricornutum* es máximo en los cultivos con 5 mg l⁻¹ de cobre (un 96% mayor que los cultivos control) (Fig. 32). Los cultivos con 0.05, 0.10, 0.25 y 0.5 mg l⁻¹ de cobre no presentan variación en su potencial de membrana con respecto a los cultivos control; a partir de 1 mg l⁻¹, el potencial de membrana aumenta a medida que aumenta la concentración de cobre. A las 96 horas de cultivo el potencial de membrana es directamente proporcional a la concentración de cobre de los cultivos, siendo máximo en los cultivos con 5 mg l⁻¹ de cobre.

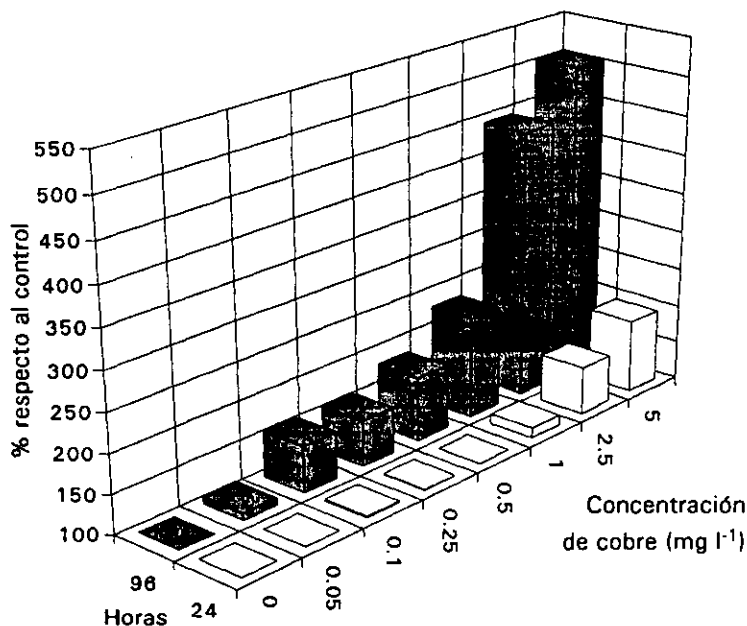


Figura 32.- Variación del potencial de membrana citoplasmática de las células de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivos con diferentes concentraciones de cobre a las 24 y a las 96 horas de exposición al metal, analizada por citometría de flujo. Los datos se expresan en porcentaje de variación de la fluorescencia celular debida a la tinción con DiOC₆(3) con respecto a la fluorescencia que presentan las células del cultivo control sin cobre (0). Las unidades de fluorescencia utilizadas son números canales.

El cobre produce un aumento del potencial de membrana mitocondrial (Fig. 33). A las 24 horas de la adición de cobre, los cultivos con más de 1 mg l⁻¹ presentan un claro aumento de su potencial mitocondrial, mientras que los cultivos con una menor concentración de cobre no presentan cambios con respecto a los cultivos control. A las 48 también se produce un aumento del potencial de membrana mitocondrial con respecto a los cultivos control en las células de los cultivos con 0.5 mg l⁻¹ de cobre. A las 96 horas de cultivo, todos los cultivos con cobre presentan un potencial mitocondrial superior al presentado por los cultivos control sin cobre.

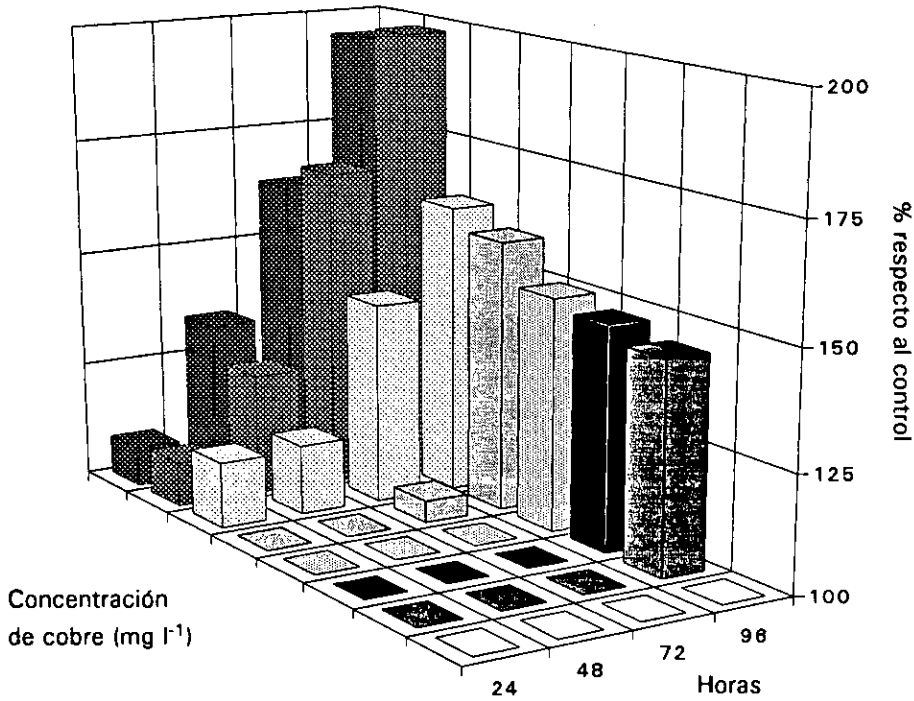


Figura 33.- Variación del potencial de membrana mitocondrial de las células de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivos con diferentes concentraciones de cobre a las 24, 48, 72 y 96 horas de exposición al metal, analizada por citometría de flujo. Los datos se expresan en porcentaje de variación de la fluorescencia celular debida a la tinción con rodamina 123 con respecto a la fluorescencia que presentan las células del cultivo control, sin cobre (0). Las unidades de fluorescencia utilizadas son números canales.

VARIACIÓN EN EL pH INTRACELULAR DE LAS CELULAS DE *Phaeodactylum tricornutum* CULTIVADA CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE COBRE

Objetivo

El pH citoplasmático en condiciones normales se mantiene próximo a la neutralidad mediante potentes mecanismos de intercambio iónico en la membrana citoplasmática, y por la elevada capacidad tampón del citosol.

La utilización de sondas fluorescentes para la medida del pH intracelular (pHi) se basa en la difusión diferencial a través de las membranas de las moléculas fluorescentes o bien en la fluorescencia variable de algunos fluorocromos a diferente pH. La fluoresceína y sus derivados, entre ellos la diclorofluoresceína (DCF), presentan un espectro de emisión pH-dependiente; los picos de emisión disminuyen considerablemente con los pH ácidos.

Diseño experimental

Se ha estudiado la posible respuesta del pHi de células de *Phaeodactylum tricornutum* expuestas a diferentes concentraciones de cobre por citometría de flujo, utilizando para ello el fluorocromo diclorofluoresceína (DCF). Las posibles alteraciones de este pHi se han estudiado tanto inmediatamente después de la adición de diferentes concentraciones de cobre al cultivo, como a lo largo del crecimiento celular con diferentes concentraciones de cobre.

Para el estudio del efecto inmediato del cobre sobre el pHi se utilizan cultivos de *P. tricornutum* con una densidad celular de 0.24×10^6 células ml^{-1} , de los que se toman alícuotas de 1 ml de cultivo, que se pasan a tubos de poliestireno para ser teñidas con DCF, tal y como se describe en el apartado de "Materiales y Métodos". De estas alícuotas se adquieren al menos 3000 células, que serán utilizadas como control de cada una de las muestras y que nos permiten comprobar que se ha alcanzado el equilibrio entre la entrada y salida de fluorocromo (fluorescencia estable). Después de alcanzado el equilibrio, a cada una de las muestras se les añade la cantidad necesaria de una solución "stock" concentrada

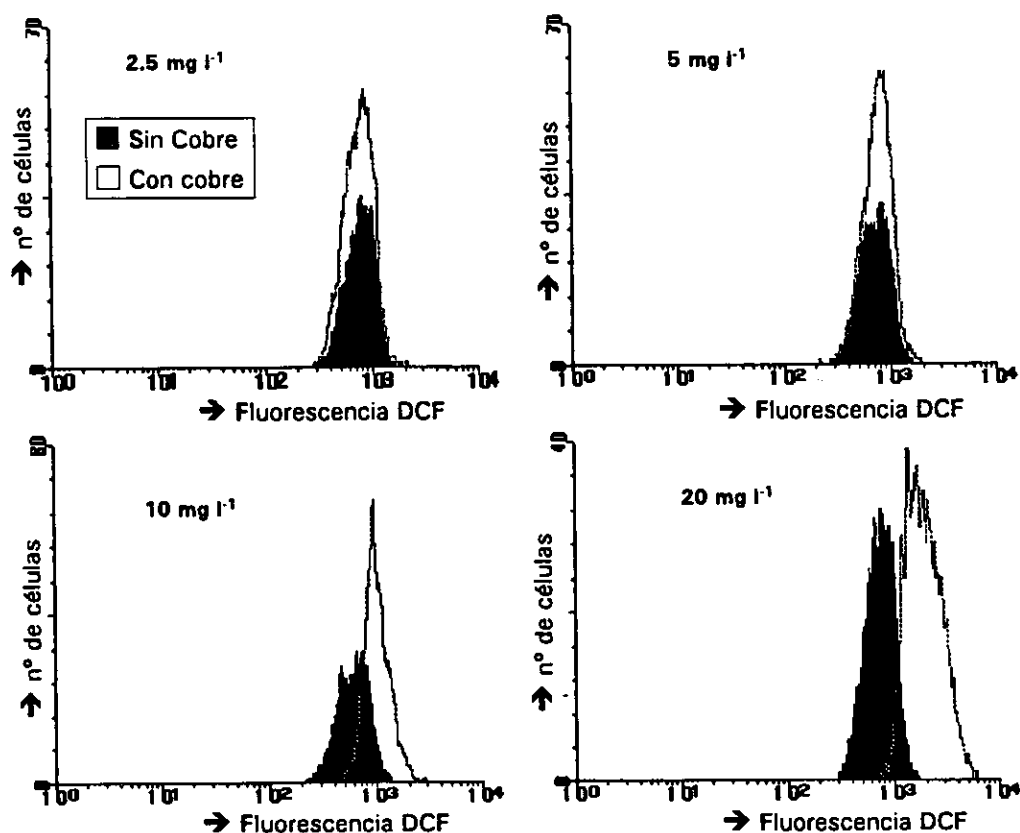


Figura 34.- Histogramas de la fluorescencia emitida por el fluorocromo diclorofluoresceína (DCF) que reflejan los cambios del pH intracelular (eje x) en células de *Phaeodactylum tricornutum* inmediatamente después de la adición de diferentes concentraciones de cobre al medio. En el eje y se representa el número de células correspondiente a cada uno de los canales de fluorescencia.

de cloruro de cobre para alcanzar una concentración final en la muestra de 2.5, 5, 10 y 20 mg l⁻¹ de cobre, además de un blanco al que no se le adiciona cobre alguno, que servirá de referencia para asegurar que el efecto observado se debe únicamente a la adición del metal y no a la técnica utilizada.

El pH intracelular también fue analizado en los cultivos de la diatomea *P. tricornutum* a lo largo de las 96 horas de cultivo expuestas al cobre. El diseño experimental es el mismo que se ha utilizado en los apartados anteriores referentes a análisis llevados a cabo por CMF. Se utilizan cultivos con una densidad celular inicial de 24×10^4 células ml⁻¹, a los que se les adicionan las diferentes

Tabla VIII.- Variación en el pH intracelular, determinado por la fluorescencia del fluorocromo diclorofluoresceína (DCF) (expresado en números canales), de las células de *Phaeodactylum tricornutum* inmediatamente después de la adición de diferentes concentraciones de cobre (expresada en mg l^{-1}) al medio.

[Cu]	Antes adición de cobre	Después adición cobre	% respecto control
2.5	787.32 ± 228.53	776.41 ± 238.26	98.61
5	732.33 ± 225.56	782.28 ± 235.45	106.82
10	739.99 ± 204.13	1083.73 ± 319.76	146.45
20	758.01 ± 225.19	1929.82 ± 827.88	254.59

concentraciones de cobre, previamente establecidas: 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1, 2.5 y 5 mg l^{-1} , además de un control al que no se le adiciona cobre. Diariamente y de cada uno de los cultivos se toman 3 alícuotas de 250 μl para ser teñidas con DCF tal y como se describe en el apartado de "Materiales y Métodos" y se analizan en el citómetro de flujo.

Resultados

Elevadas concentraciones de cobre provocan un aumento inmediato del pH intracelular de la microalga marina *P. tricornutum*. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 34. Las células de *P. tricornutum* expuestas a 2.5 y 5 mg l^{-1} de cobre no presentan cambios significativos en su pH_i con respecto a los cultivos control, mientras que en los cultivos a los que se les adicionan 10 y 20 mg l^{-1} de cobre se produce un importante aumento del pH de forma inmediata. En la tabla VIII se muestran los resultados de la estadística proporcionada por el sistema de software del citómetro, de cada uno de los histogramas representados en la figura 34, correspondientes al pH intracelular de *P. tricornutum* con diferentes concentraciones de cobre.

En la figura 35 se representan los datos del cambio observado en el pH intracelular durante las 96 horas de cultivo, expresados como porcentaje de la autofluorescencia de las células control (sin cobre) de acuerdo con la ecuación descrita por Reader *et al.* (1993). Tras 8 horas de adición del cobre todos los cultivos presentan un ligero aumento de su pH_i con respecto a los cultivos control. A las

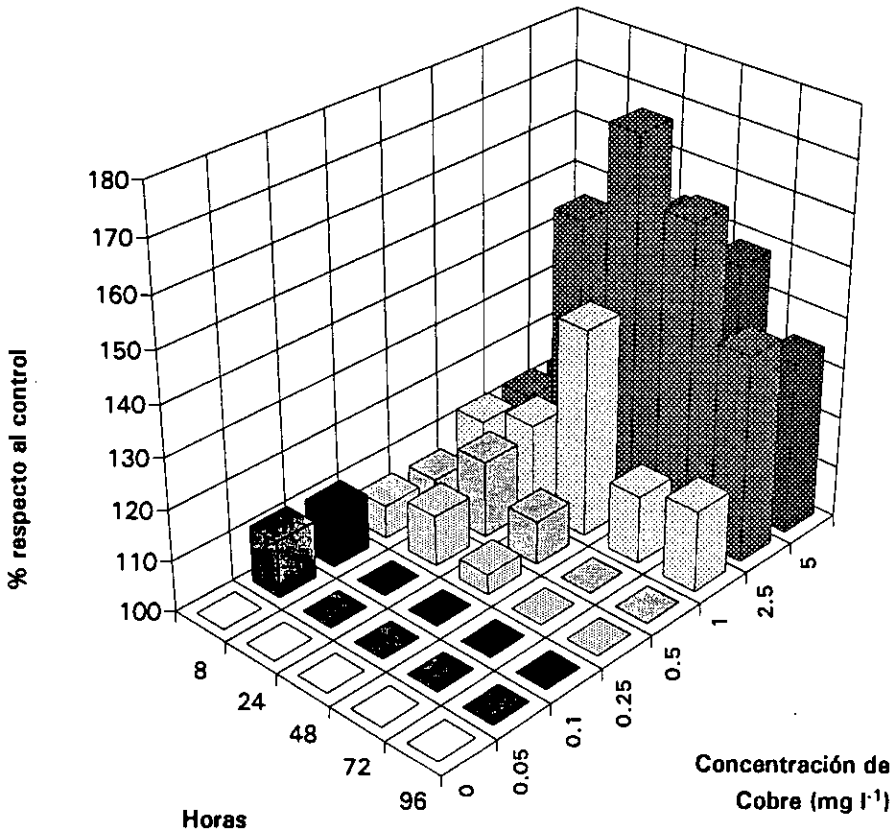


Figura 35.- Variación del pH intracelular de las células de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivos con diferentes concentraciones de cobre a lo largo de 96 horas de exposición al metal, analizada por citometría de flujo. Los datos se expresan en porcentaje de variación de la fluorescencia celular debida a la tinción con diclorofluoresceína (DCF) con respecto a la fluorescencia que presentan las células del cultivo control, sin cobre (0). Las unidades de fluorescencia utilizadas son números canales.

24 horas de cultivo, el pHi es máximo en los cultivos con 2.5 y 5 mg l⁻¹ de cobre, mientras que los cultivos con 0.05 y 0.10 mg l⁻¹ han recuperado su pHi inicial (Fig. 35). A las 72 y 96 horas de cultivo sólo los cultivos con más de 1 mg l⁻¹ de cobre presentan un pHi superior al de los cultivos control. A lo largo del tiempo el pHi se recupera en relación inversa a la concentración de cobre del medio.

BIOACUMULACIÓN DE COBRE EN *Phaeodactylum tricornutum*

Objetivo

La acumulación de diversos elementos, entre ellos los metales pesados, es una característica de los organismos acuáticos y de las microalgas en particular. Este hecho tiene gran importancia ya que a partir de estos organismos se produce la transmisión de estos metales a organismos superiores a través de la cadena trófica. Además, la capacidad de bioacumulación es una propiedad que debe tenerse en cuenta cuando se analiza la posibilidad de utilizar biomasa microalgal para la retirada de los metales de los ecosistemas naturales (Volesky, 1990; Macaskie, 1991).

En esta experiencia, se cuantifica la cantidad de cobre que la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum* es capaz de retirar del medio, así como en que medida el cobre retirado es bioacumulado o bioadsorbido, en cultivos con diferentes concentraciones de este metal.

Diseño experimental

Se realizan cultivos de *P. tricornutum* con una densidad celular inicial de 24×10^4 células ml^{-1} , en botellas PYREX con 500 ml de medio y diferentes concentraciones de cobre: 0.025, 0.05, 0.10, 0.25, 0.5 y 1 mg l^{-1} . Todos los cultivos se realizan por triplicado, incluidos los cultivos control a los que no se les adiciona cobre. La cantidad de cobre retirada por las microalgas se analiza a las 72 horas de exposición al metal, según el protocolo descrito en el apartado de "Materiales y Métodos".

Resultados

P. tricornutum es capaz de acumular importantes cantidades de cobre adherido a su pared celular (Fig. 36). La cantidad de cobre adherido a la superficie celular aumenta cuando la concentración del metal en el medio se incrementa. En los cultivos con 0.025 mg l^{-1} de cobre en el medio la cantidad de metal que se

adhiera a la superficie celular es $0.018 \text{ mg} \times 10^{-6} \text{ célula}^{-1}$, mientras que cuando la concentración de cobre en el medio es 1 mg l^{-1} , la cantidad de cobre adherido a la superficie celular es $1.512 \text{ mg} \times 10^{-6} \text{ célula}^{-1}$. A las concentraciones de cobre ensayadas no se alcanza la saturación en la capacidad de acumulación de cobre en su pared, aunque como se observa en la figura 36, se tiende a dicha saturación. La cantidad de cobre adherida a la superficie celular es función de la cantidad de cobre en el medio y de la densidad celular de cada uno de los cultivos, que desciende a medida que aumenta la concentración de cobre en el medio, como ya se ha visto en el apartado de crecimiento.

La adhesión del metal a la superficie celular es un proceso rápido que no depende de energía. Después de esta adsorción, el cobre puede penetrar en la célula y acumularse en su interior, siendo éste un proceso que necesita energía. *P. tricornutum* acumula cobre intracelularmente y la concentración de metal acumulado aumenta con la cantidad de cobre en el medio (Fig. 37). La cantidad de cobre acumulado intracelularmente es proporcional a la cantidad de cobre del medio en los cultivos con concentraciones de cobre entre 0.025 y 0.5 mg l^{-1} . Concentraciones superiores de cobre en el medio no producen un incremento en la cantidad de cobre acumulado en el interior de la célula; así, en los cultivos con 0.5 mg l^{-1} de cobre la concentración intracelular del metal es $0.034 \mu\text{g} \times 10^{-6} \text{ célula}^{-1}$, mientras que cuando la concentración de cobre en el medio se duplica no se produce un incremento significativo en la cantidad de cobre intracelular ($0.037 \mu\text{g} \times 10^{-6} \text{ célula}^{-1}$) (Fig. 37). Estos resultados indican que la capacidad de acumulación intracelular de cobre se satura a partir de 0.5 mg l^{-1} de cobre en el medio.

Si representamos la cantidad de cobre adsorbido frente al cobre intracelular, expresado en $\mu\text{g} \times 10^{-6} \text{ célula}^{-1}$ (Fig. 38) se obtiene de nuevo una curva asintótica, similar a la observada para el cobre acumulado intracelularmente, indicando que el cobre adsorbido todavía puede seguir aumentando mientras que el cobre intracelular permanece constante.

En la tabla IX se presentan las cantidades de cobre retiradas del medio por las células, expresadas en μg de cobre por litro de cultivo. Este valor es función por una parte de la concentración de cobre adicionada al medio y por otra de la densidad celular alcanzada por los cultivos después de 72 horas de exposición al

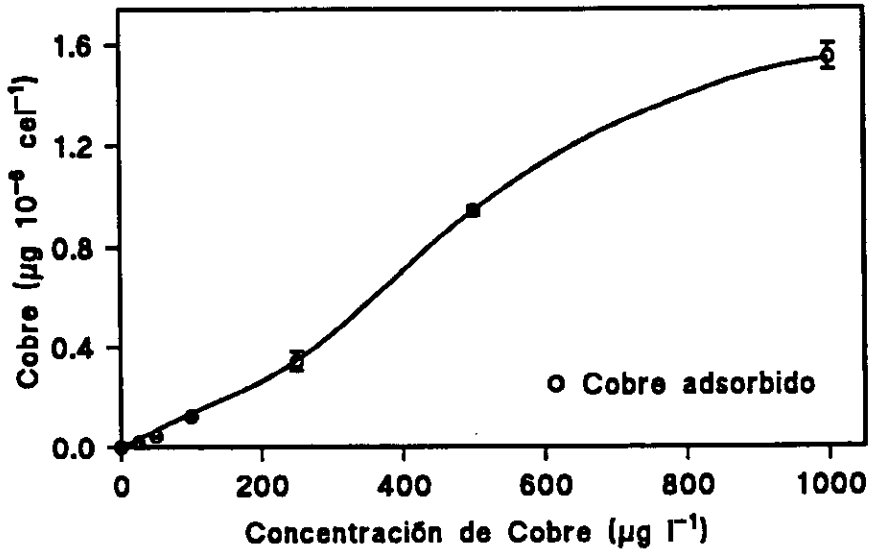


Figura 36.- Cobre adsorbido (expresado en $\mu\text{g } 10^{-6} \text{ célula}^{-1}$) en la superficie de las células de *P. tricornutum* cultivadas con distintas concentraciones de cobre en el medio.

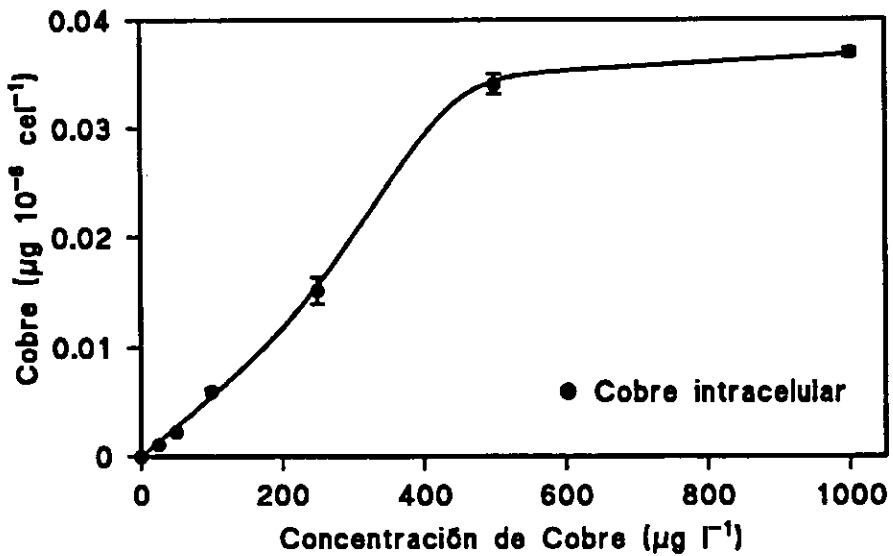


Figura 37.- Cobre intracelular (expresado en $\mu\text{g } 10^{-6} \text{ célula}^{-1}$) acumulado por las células de *P. tricornutum* cultivadas con distintas concentraciones de cobre en el medio.

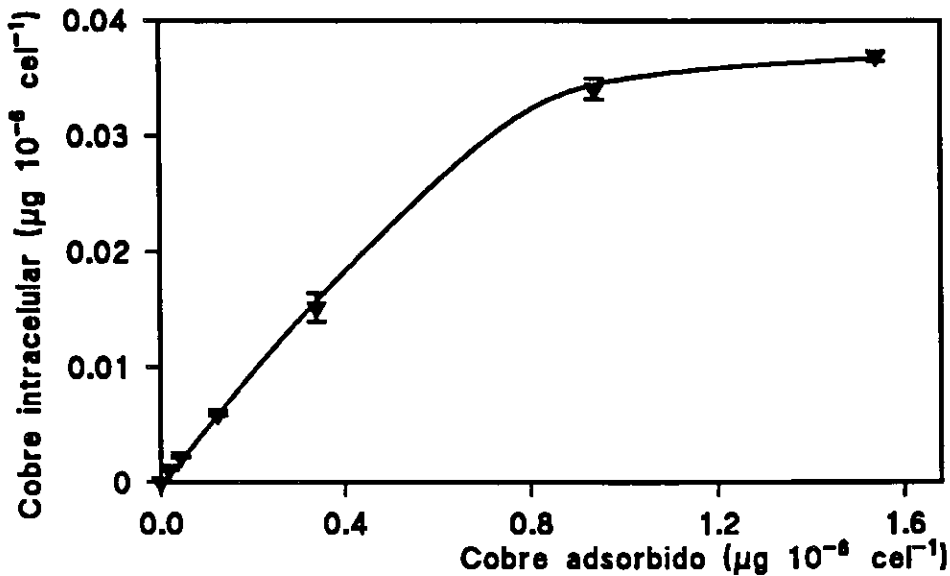


Figura 3B.- Relación entre el cobre adsorbido e intracelular (expresados en $\mu\text{g } 10^{-6} \text{ celula}^{-1}$) acumulado por las células de *P. tricornutum* cultivadas con distintas concentraciones de cobre en el medio.

Tabla IX.- Cobre retirado del medio (expresado en $\mu\text{g } \text{l}^{-1}$) por las células de *P. tricornutum* cultivadas con distintas concentraciones de cobre en el medio en cada una de las fracciones: cobre intracelular, cobre adsorbido y cobre total retirado del medio

Ta ($\text{mg } \text{l}^{-1}$)	Intracelular (In) ($\mu\text{g } \text{l}^{-1}$)	Adsorbido (Ad) ($\mu\text{g } \text{l}^{-1}$)	Total retirado(Tr) ($\mu\text{g } \text{l}^{-1}$)
0.025	0.69 + 0.00	12.27 + 0.00	12.93 ± 0.000
0.05	1.38 + 0.002	25.72 + 0.02	27.10 ± 0.021
0.1	3.14 + 0.004	62.61 + 0.04	65.74 ± 0.045
0.25	5.93 + 0.010	128.14 + 7.57	134.07 ± 7.587
0.5	9.99 + 0.023	266.35 + 3.59	276.34 ± 3.671
1	10.04 + 0.027	410.93 + 11.21	420.97 ± 11.249

Ta: cobre añadido a cada cultivo; In: Cobre intracelular determinado en la biomasa microalgal; Ad: cobre adherido a las biomasa microalgal; Tr: Cobre total retirado del medio.

Tabla X.- Relaciones entre las distintas fracciones de cobre acumuladas por *P. tricornutum* cultivada con distintas concentraciones de cobre en el medio.

[Cu]	Relaciones			
	Tr/Ta (%)	Ad/Tr (%)	In/Tr (%)	Ad/In
0.025	51.72	94.6	5.4	17.63
0.05	54.20	94.9	5.0	18.63
0.1	65.74	95.2	4.8	19.93
0.25	53.62	95.6	4.6	21.57
0.5	55.26	96.4	3.5	26.68
1	42.09	97.6	2.3	40.93

Ta: cobre añadido a cada cultivo; Tr: Cobre total retirado del medio; Ad: cobre adherido a las biomasa microalgal; In: Cobre intracelular determinado en la biomasa microalgal.

metal. La cantidad de cobre total retirado por litro de cultivo (adsorbido a la superficie celular + intracelular) es aproximadamente el 50% del cobre añadido al medio para cualquiera de las concentraciones ensayadas (Tabla IX).

Los resultados obtenidos muestran que la mayor parte del cobre ligado a las microalgas se encuentra unido a la superficie de las mismas, con relaciones entre cobre adsorbido y cobre retirado total superiores al 90% (94-97%), mientras que el porcentaje de cobre acumulado intracelularmente se sitúa entre el 3 y el 6% del cobre total retirado (Tabla X).

El cobre total retirado del medio de cultivo, expresado como porcentaje del cobre añadido, aumenta con la concentración de este metal en el medio; sin embargo, en los cultivos con las mayores concentraciones de cobre ensayadas se produce un descenso del porcentaje de cobre retirado, que está relacionado con el hecho de que la densidad celular a las 72 horas de exposición al metal es menor en estas concentraciones (Tabla X). Así, el máximo porcentaje de cobre retirado respecto al total añadido alcanza valores del 65% en los cultivos con una concentración de cobre de 0.1 mg l^{-1} (Tabla X).

VARIACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DEL COBRE SOBRE *Phaeodactylum tricornutum* DEBIDO A LA PRESENCIA DE ZINC, HIERRO Y CADMIO EN EL MEDIO DE CULTIVO

Objetivo

La interacción de metales traza y microalgas marinas es recíproca: no solo los metales traza influyen sobre las microalgas marinas, ya que la comunidad algal como un todo afecta a la concentración y especiación química de los metales traza, produciéndose un "feedback" biológico en la disponibilidad de esos metales. Sin embargo, las interacciones entre metales traza no se han estudiado con profundidad en las microalgas, y existen pocos trabajos sobre efectos comparados de metales tóxicos adicionados individualmente y de sus efectos cuando estos metales se combinan.

La toxicidad de los metales pesados está condicionada por su especiación química. Formas iónicas diferentes de un metal con distintas valencias pueden ser diferencialmente tóxicas para las algas utilizadas en el test de toxicidad. Además, la toxicidad de un metal puede estar influenciada por la concentración de otros metales (Braek *et al.*, 1980) y nutrientes algales (Lewin, 1954; Morel *et al.*, 1978; Rueter & Morel, 1981).

En la naturaleza, los organismos están expuestos a numerosos metales, y el comportamiento o efectos de esos metales sobre ellos no puede predecirse por una suma de los efectos metal-metal. La presencia de metales pesados puede influir en la toxicidad de otro metal mediante un efecto simplemente aditivo o por interacciones sinérgicas o antagónicas. De forma similar, otros contaminantes pueden influir en la toxicidad de metales pesados. Un mismo metal puede mostrar diferentes interacciones dependiendo de las condiciones ambientales y las concentraciones relativas de los respectivos metales.

El conocimiento de las interacciones metal-metal no sólo es importante porque afectan a la especiación del metal, sino también porque intervienen en la incorporación y destino del metal dentro del organismo.

Se intenta establecer el posible efecto sinérgico o antagónico de 3 metales diferentes, zinc, hierro y cadmio, y el cobre en cultivos de la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin.

Diseño experimental

Para el estudio de las interacciones, se añaden 0.5 mg l^{-1} del metal que se va a ensayar a un cultivo de *P. tricornutum*. Este cultivo se establece 48 horas antes del inicio de la experiencia, en agua de mar sin nutrientes.

Tras este tiempo, partiendo del cultivo con 0.5 mg l^{-1} del metal a ensayar, se establecen 7 series de cultivos de *P. tricornutum* con una densidad celular inicial de 24×10^4 células ml^{-1} . A cada una de estas series se le añaden diferentes cantidades de una solución stock de cobre, de forma que se alcancen concentraciones de: 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mg l^{-1} de cobre, además de un control sin metales y otro control con 0.5 mg l^{-1} del metal a ensayar y sin cobre, obteniendo así las siguientes series de cultivos:

Serie	[Cobre]*	[Metal a ensayar]*
I	0	0
II	0	0.5
III	0.025	0.5
IV	0.05	0.5
V	0.1	0.5
VI	0.25	0.5
VII	0.50	0.5
VIII	1	0.5

* Las concentraciones se expresan en mg l^{-1}

Todos los cultivos se llevan a cabo en las condiciones descritas en el apartado "Materiales y Métodos".

Diariamente, desde el comienzo de la experiencia hasta las 96 h de cultivo, se retiran alícuotas de los cultivos para la determinación de la densidad celular.

Las concentraciones efectivas que reducen el crecimiento de la población de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* un 50% respecto al control (EC_{50}) se determinan en test de exposición de cultivos estáticos a las 48 y 96 horas.

Para la determinación del efecto sinérgico o antagónico entre el cobre y los metales ensayados (zinc, hierro y cadmio), se utiliza la fórmula de Colby (revisada por Rai *et al.*, 1981) con los datos de crecimiento para calcular la toxicidad esperada de los metales si la acción dimetálica era aditiva,

$$E = XY/100$$

dónde E= la densidad de población esperada del alga como un porcentaje del control, X= la densidad de población del alga como un porcentaje del control cuando se expone al metal X, e Y= la densidad de población del alga como porcentaje del control cuando se expone al metal Y. Las toxicidades observadas mayores o menores que las esperadas, indican respectivamente interacciones sinérgicas o antagónicas.

Resultados

Para determinar el efecto de los diferentes metales en combinación con el cobre sobre *P. tricornutum*, se analiza el crecimiento en función de la concentración de cobre en el medio de cultivo.

Cultivos control

La figura 39 representa la curva de crecimiento de los cultivos control (no contienen ningún metal), frente a los cultivos a los que se añaden 0.5 mg l^{-1} de zinc, hierro o cadmio. Los resultados muestran que no existen diferencias significativas entre los cultivos control y a los que se añaden 0.5 mg l^{-1} de zinc y 0.5 mg l^{-1} de hierro, con valores de 149.25, 152.75 y 143.58×10^4 células ml^{-1} , respectivamente (Tabla XI). Por el contrario, los cultivos a los que se añaden 0.5 mg l^{-1} de cadmio alcanzan una densidad celular final significativamente menor, con un valor de 102.5×10^4 células ml^{-1} .

Tabla XI- Densidad celular ($\times 10^4$ células ml^{-1}) máxima alcanzada en los cultivos de *P. tricornutum* realizados con distintas concentraciones de cobre y concentración constante de zinc, hierro o cadmio. EC_{50} para cada combinación de cobre y metal acompañante. Las concentraciones de metales se expresan en mg l^{-1} .

[Cu]	Control	Cu+0.5 Zn	Cu+0.5 Fe	Cu + 0.5 Cd
0	149.25 + 11.93	152.75 + 9.74	143.58 + 16.94	102.50 + 7.80
0.025	134.12 + 16.94	157.25 + 6.85	118.16 + 9.98	102.62 + 5.85
0.05	135.00 + 14.25	132.00 + 3.74	89.50 + 11.67	92.00 + 9.74
0.1	75.62 + 9.87	115.75 + 9.03	71.75 + 7.26	92.75 + 5.17
0.25	62.00 + 11.61	93.00 + 3.16	25.25 + 12.63	27.25 + 2.82
0.5	37.50 + 1.80	69.25 + 7.45	17.33 + 3.20	12.38 + 1.77
1	24.00 + 3.00	53.50 + 6.03	2.58 + 1.08	11.63 + 3.07
EC_{50} (48 h)	0.184	0.560	0.090	0.179
EC_{50} (96 h)	0.180	0.430	0.080	0.194

Cultivos con 0.025 mg l^{-1} de cobre

Las densidades celulares y el crecimiento en estos cultivos se representan en la tabla XI y en la figura 40. Los cultivos que alcanzan la máxima densidad celular final son los cultivos con zinc, con una densidad final de 157.25×10^4 células ml^{-1} , mientras que los cultivos con cadmio alcanzan la menor densidad celular final con 102.62 células ml^{-1} .

Cultivos con 0.05 mg l^{-1} de cobre

Las densidades celulares finales en estos cultivos (Tabla XI, Fig.41) presentan valores muy similares en los cultivos que solo contienen cobre y en los cultivos a los que se les ha adicionado zinc, con valores de 135 y 132×10^4 células ml^{-1} , respectivamente. Los cultivos con cadmio alcanzan una densidad celular final de 92×10^4 células ml^{-1} , mientras que los cultivos que contienen hierro muestran la menor densidad final con un valor de 89.5×10^4 células ml^{-1} .

Cultivos con 0.1 mg l^{-1} de cobre

A esta concentración, el cobre presenta ya un efecto inhibitorio sobre el crecimiento (Tabla XI, Fig. 46). En estos cultivos, la densidad celular final máxima

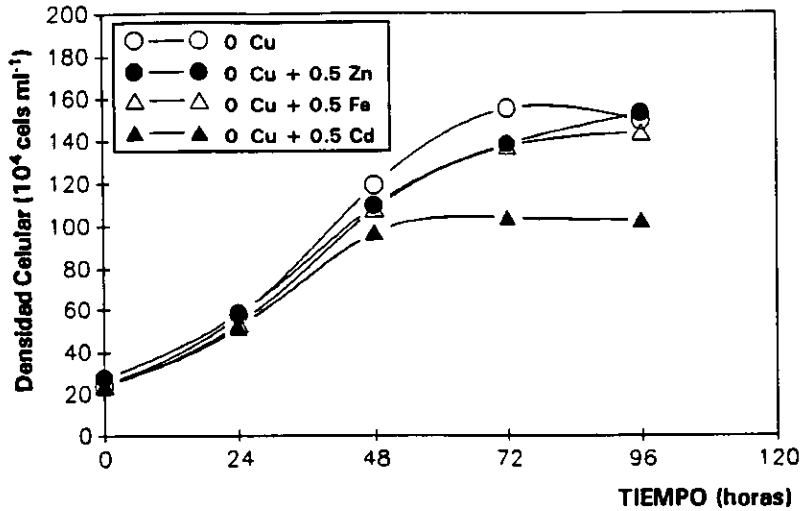


Figura 39.- Crecimiento de los cultivos de *P. tricornutum* (expresado en $\times 10^4$ células ml^{-1}) sin cobre y con zinc, hierro o cadmio en una concentración de 0.5 mg l^{-1} .

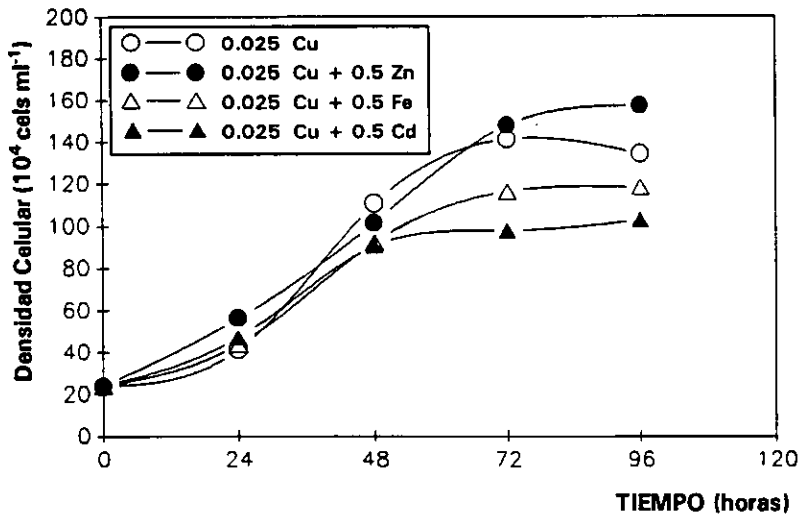


Figura 40.- Crecimiento de los cultivos de *P. tricornutum* (expresado en $\times 10^4$ células ml^{-1}) con 0.025 mg l^{-1} de cobre solo y con zinc, hierro o cadmio en una concentración de 0.5 mg l^{-1} .

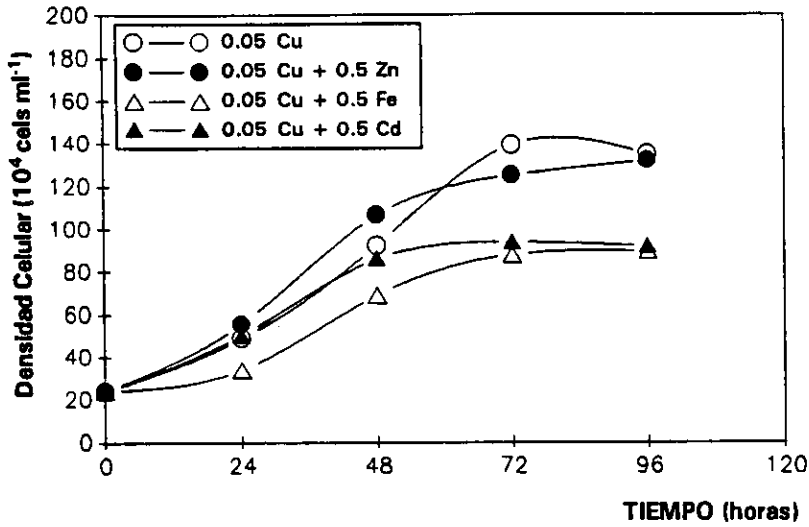


Figura 41.- Crecimiento de los cultivos de *P. tricornutum* (expresado en $\times 10^4$ células ml^{-1}) con 0.05 mg l^{-1} de cobre solo y con zinc, hierro o cadmio en una concentración de 0.5 mg l^{-1} .

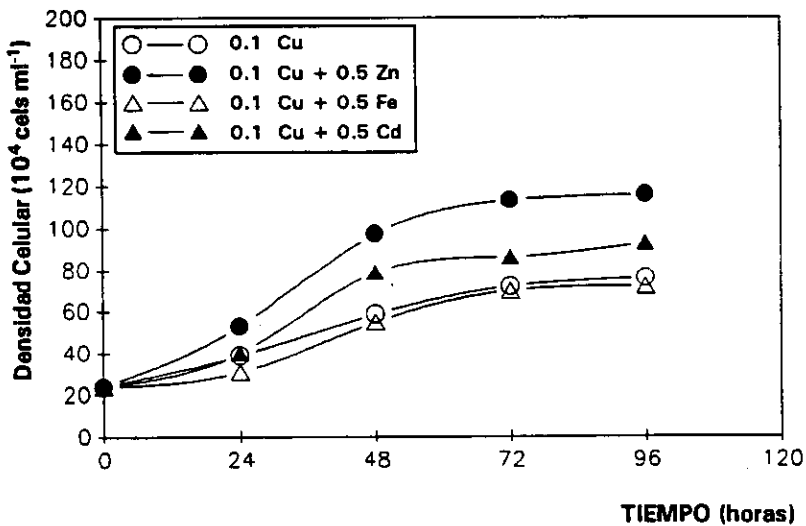


Figura 42.- Crecimiento de los cultivos de *P. tricornutum* (expresado en $\times 10^4$ células ml^{-1}) con 0.10 mg l^{-1} de cobre solo y con zinc, hierro o cadmio en una concentración de 0.5 mg l^{-1} .

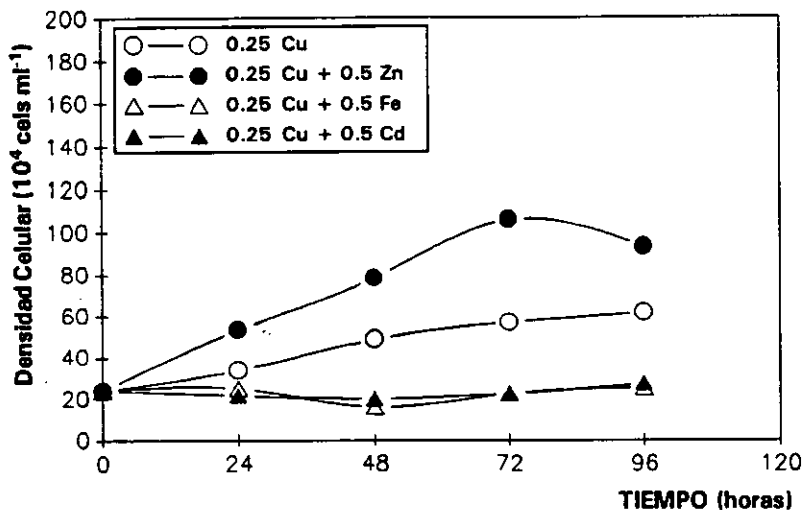


Figura 43.- Crecimiento de los cultivos de *P. tricornutum* (expresado en $\times 10^4$ células ml^{-1}) con 0.25 mg l^{-1} de cobre solo y con zinc, hierro o cadmio en una concentración de 0.5 mg l^{-1} .

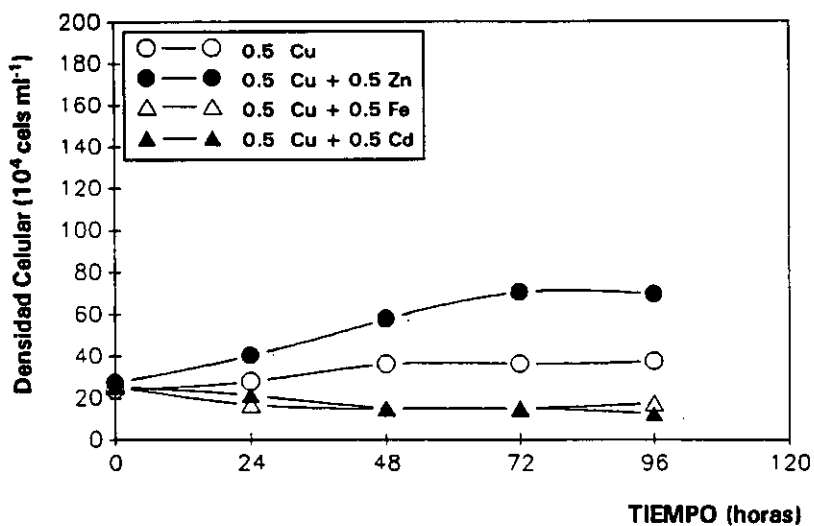


Figura 44.- Crecimiento de los cultivos de *P. tricornutum* (expresado en $\times 10^4$ células ml^{-1}) con 0.5 mg l^{-1} de cobre solo y con zinc, hierro o cadmio en una concentración de 0.5 mg l^{-1} .

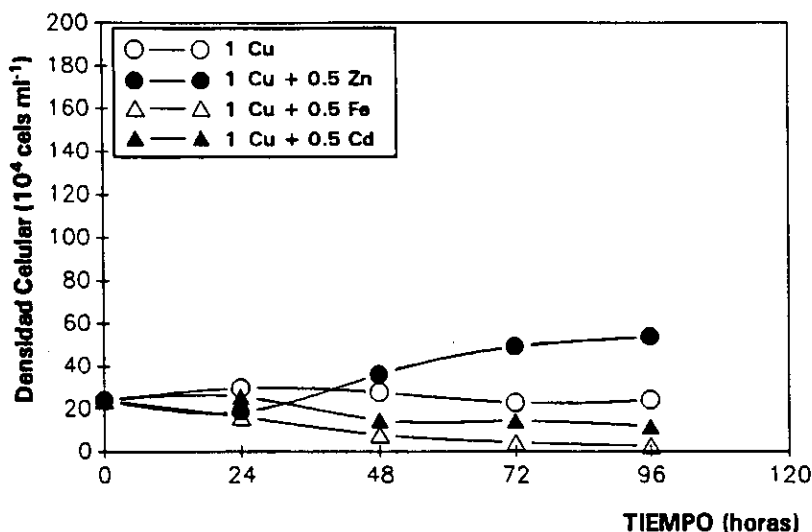


Figura 45.- Crecimiento de los cultivos de *P. tricornutum* (expresado en $\times 10^4$ células ml^{-1}) con 1 mg l^{-1} de cobre solo y con zinc, hierro o cadmio en una concentración de 0.5 mg l^{-1} .

se obtiene en los cultivos a los que se adiciona zinc, con un valor de 115.75×10^4 células ml^{-1} . Los restantes cultivos alcanzan densidades celulares significativamente menores, (tabla XI y Fig. 42).

Cultivos con 0.25 mg l^{-1} de cobre

Las densidades celulares finales difieren dependiendo del metal adicionado al medio de cultivo (Tabla XI; Fig. 43). La mayor densidad celular se obtiene de nuevo en los cultivos con zinc, con 93×10^4 células ml^{-1} . La densidad celular menor la presentan los cultivos con hierro, donde la densidad celular final es de 25.25×10^4 células ml^{-1} .

Cultivos con 0.50 mg l^{-1} de cobre

Los resultados obtenidos en estos cultivos (Tabla X; Fig. 44), muestran densidades celulares finales muy diferentes en función del metal que se ensaya frente al cobre, ya que la densidad celular final máxima se obtiene en los cultivos con zinc, con 69.25×10^4 células ml^{-1} , mientras que en los cultivos con cadmio la densidad celular final es de 12.38×10^4 células ml^{-1} .

Cultivos con 1 mg l⁻¹ de cobre

De nuevo las densidades celulares alcanzadas en estos cultivos presentan grandes diferencias (Tabla X; Fig. 45). Mientras los cultivos de zinc presentan un valor de 53.5×10^4 células ml⁻¹, los cultivos de hierro alcanzan un valor de 2.58×10^4 células ml⁻¹.

Interacción Cobre-Zinc

Los resultados obtenidos (Figs. 46 y 47), muestran que para 0.5 mg l⁻¹ de zinc la relación con las diferentes concentraciones de cobre ensayadas es antagónica, ya que las toxicidades son menores a las esperadas. La EC₅₀ a las 48 horas es 0.56 mg l⁻¹ de cobre, mientras que a las 96 horas de cultivo es de 0.43 mg l⁻¹ de cobre (Tabla XI). La EC₅₀ en los cultivos a los que se añaden cobre y zinc es aproximadamente 3 veces superior a la obtenida en los cultivos a los que se le ha adicionado cobre como único metal; por lo tanto, la adición de zinc alivia el efecto tóxico del cobre.

Interacción Cobre-Hierro

Los resultados obtenidos (Fig. 43 y 48) en los cultivos con 0.5 mg l⁻¹ de hierro muestran una relación de tipo sinérgico con las diferentes concentraciones de cobre ensayadas, ya que las densidades celulares son menores a las esperadas si el efecto de acción de estos dos metales fuera aditiva, de forma que el hierro incrementa la toxicidad del cobre sobre el crecimiento de *P. tricornutum*. A las 48 horas de cultivo, la EC₅₀ es 0.09 mg l⁻¹ de cobre, alcanzando un valor muy similar a las 96 horas de cultivo (0.08 mg l⁻¹ de cobre) (Tabla XI). La EC₅₀ obtenida en los cultivos con cobre y hierro es dos veces menor a la que se alcanza en los cultivos a los que solo se les adiciona cobre.

Interacción Cobre-Cadmio

Los resultados que se obtienen en los cultivos con 0.5 mg l⁻¹ de cadmio (Figs. 46 y 49) indican que este metal interacciona de forma sinérgica con el cobre, produciendo una mayor inhibición sobre el crecimiento de *P. tricornutum*, y como consecuencia una menor tasa de crecimiento en comparación con la que se

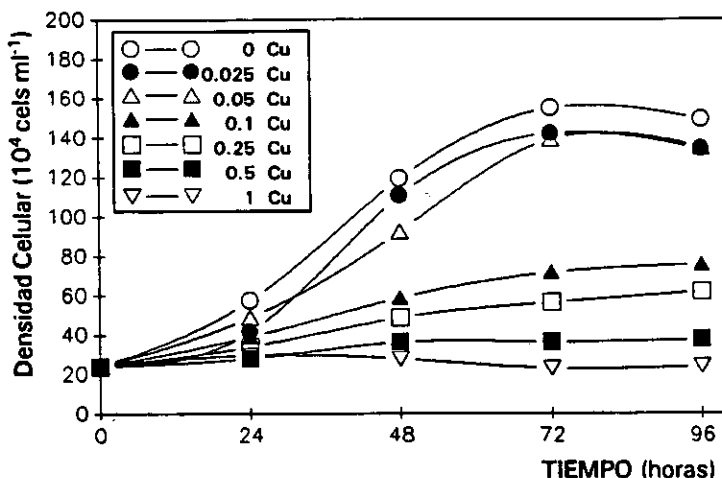


Figura 46.- Crecimiento de los cultivos de *P. tricornutum* con distintas concentraciones de cobre (expresada en mg l⁻¹). La ecuaciones de cada curva son:

0 Cu:	$N_t = 1/157.4 + 121.1^{(-1.588t)}$	$r^2 = 0.99$
0.025 Cu:	$N_t = 1/142.3 + 119.74^{(-1.8t)}$	$r^2 = 0.97$
0.05 Cu:	$N_t = 1/147 + 109.56^{(-1.292t)}$	$r^2 = 0.98$
0.1 Cu:	$N_t = 1/81.26 + 35.56^{(-0.93t)}$	$r^2 = 0.99$
0.25 Cu:	$N_t = 1/68.53 + 22.13^{(-0.74t)}$	$r^2 = 0.99$
0.5 Cu:	$N_t = 1/39.07 - 7.71^{(-0.78t)}$	$r^2 = 0.94$
1 Cu:	$N_t = 1/0.6 - 53.04^{(-0.00056t)}$	$r^2 = 0.12$

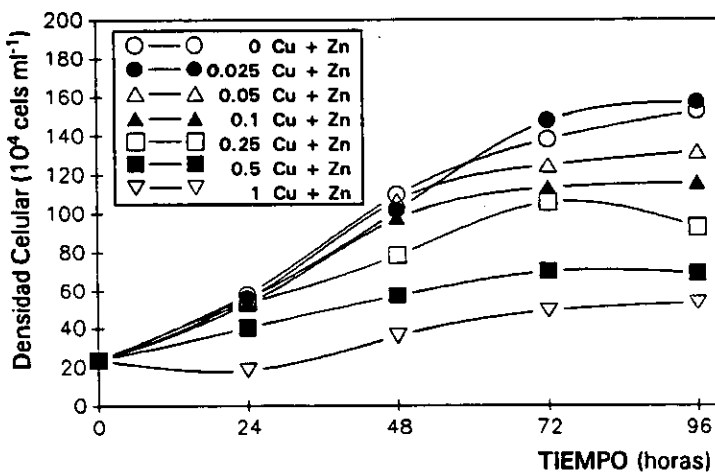


Figura 47.- Crecimiento de los cultivos de *P. tricornutum* con distintas concentraciones de cobre (expresada en mg l⁻¹) y 0.5 mg l⁻¹ de zinc. La ecuaciones de cada curva son:

0 Cu + 0.5 Zn:	$N_t = 1/159.6 + 109.08^{(-1.195t)}$	$r^2 = 0.99$
0.025 Cu + 0.5 Zn:	$N_t = 1/171.3 + 122.82^{(-1.126t)}$	$r^2 = 0.99$
0.05 Cu + 0.5 Zn:	$N_t = 1/135.8 + 89.08^{(-1.355t)}$	$r^2 = 0.99$
0.1 Cu + 0.5 Zn:	$N_t = 1/120.2 + 73.16^{(-1.345t)}$	$r^2 = 0.99$
0.25 Cu + 0.5 Zn:	$N_t = 1/102.1 + 51.1^{(-1.245t)}$	$r^2 = 0.95$
0.5 Cu + 0.5 Zn:	$N_t = 1/75.15 + 23.25^{(-0.909t)}$	$r^2 = 0.98$
1 Cu + 0.5 Zn:	$N_t = 1/207.6 + 164.58^{(-0.288t)}$	$r^2 = 0.83$

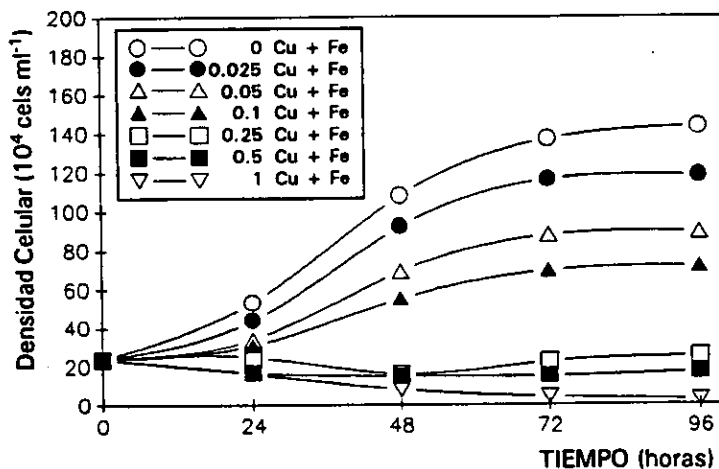


Figura 48.- Crecimiento de los cultivos de *P. tricomutum* con distintas concentraciones de cobre (expresada en mg l^{-1}) y 0.5 mg l^{-1} de hierro. La ecuaciones de cada curva son:

0 Cu + 0.5 Fe:	$N_t = 1/149.7 + 107.64^{(-1.350t)}$	$r^2 = 0.99$
0.025 Cu + 0.5 Fe:	$N_t = 1/124.9 + 86.56^{(-1.317t)}$	$r^2 = 0.98$
0.05 Cu + 0.5 Fe:	$N_t = 1/97.84 + 58.32^{(-1.065t)}$	$r^2 = 0.96$
0.1 Cu + 0.5 Fe:	$N_t = 1/81.71 + 38.37^{(-0.825t)}$	$r^2 = 0.96$
0.25 Cu + 0.5 Fe:	No se ajustan a una función logística	
0.5 Cu + 0.5 Fe:	$N_t = 1/15.82 - 35.7^{(-2.193t)}$	$r^2 = 0.95$
1 Cu + 0.5 Fe:	No se ajustan a una función logística	

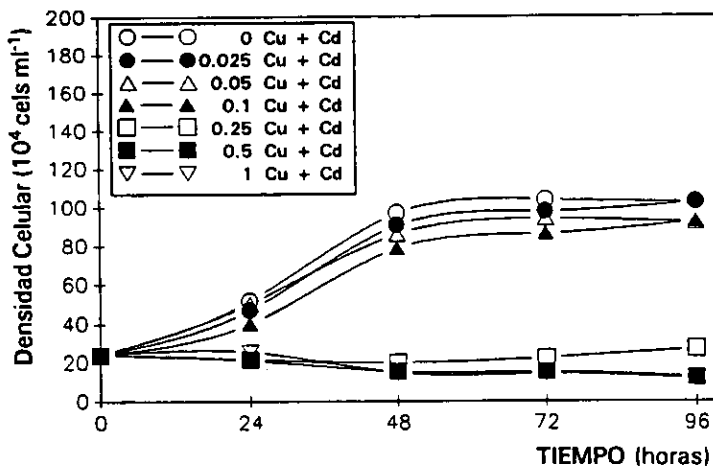
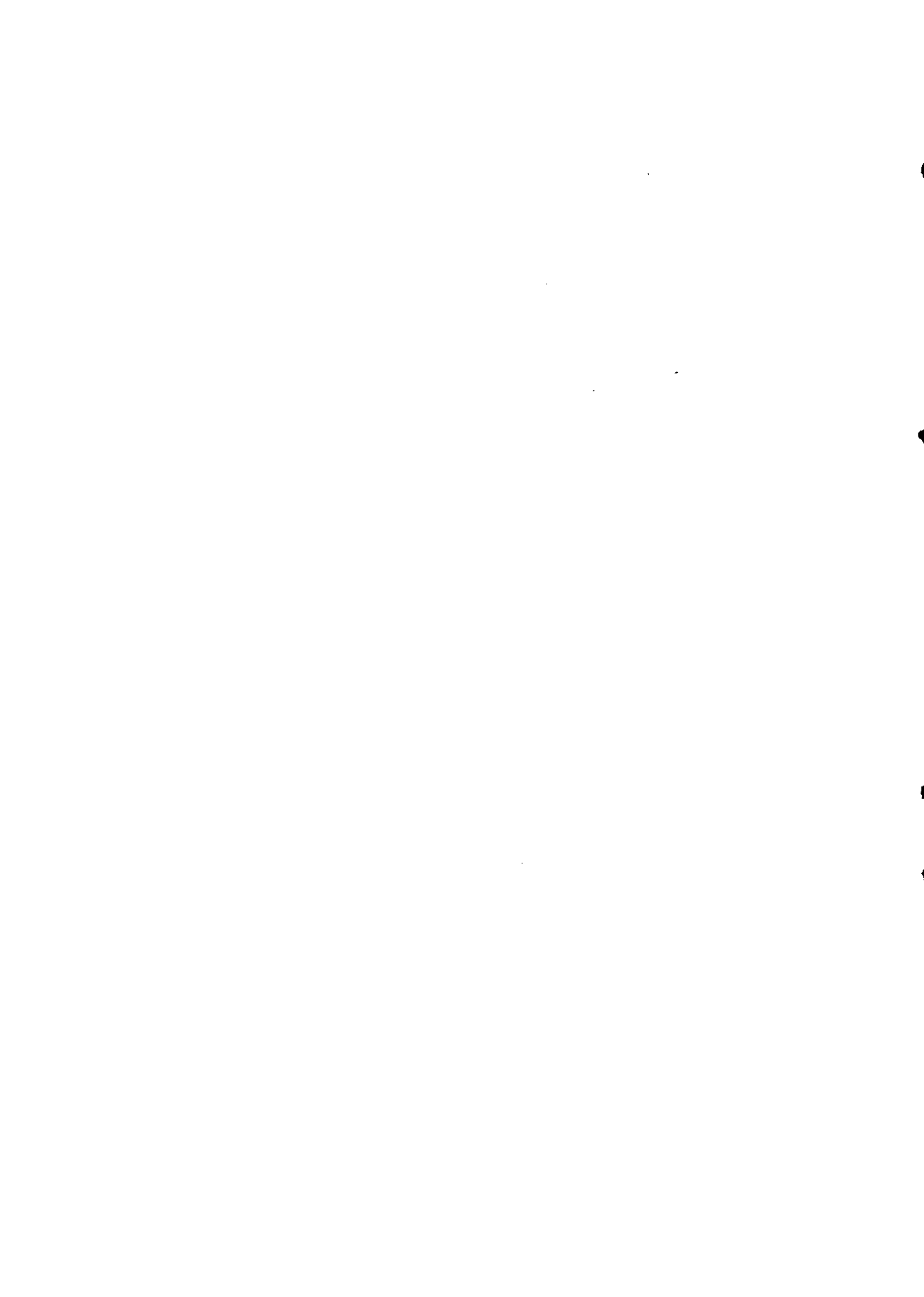


Figura 49.- Crecimiento de los cultivos de *P. tricomutum* con distintas concentraciones de cobre (expresada en mg l^{-1}) y 0.5 mg l^{-1} de cadmio. La ecuaciones de cada curva son:

0 Cu + 0.5 Cd:	$N_t = 1/106.7 + 65.12^{(-1.583t)}$	$r^2 = 0.98$
0.025 Cu + 0.5 Cd:	$N_t = 1/105.2 + 63.02^{(-1.404t)}$	$r^2 = 0.98$
0.05 Cu + 0.5 Cd:	$N_t = 1/96.08 + 51.28^{(-1.473t)}$	$r^2 = 0.98$
0.1 Cu + 0.5 Cd:	$N_t = 1/96.08 + 53.74^{(-1.208t)}$	$r^2 = 0.97$
0.25 Cu + 0.5 Cd:	No se ajustan a una función logística	
0.5 Cu + 0.5 Cd:	$N_t = 1/0.015 - 51.345^{(-0.00016t)}$	$r^2 = 0.96$
1 Cu + 0.5 Cd:	No se ajustan a una función logística	

obtiene cuando el metal introducido en el medio de cultivo es únicamente el cobre. La EC_{50} que se obtiene a las 48 horas es de 0.179 mg l^{-1} de cobre y a las 96 horas es de 0.194 mg l^{-1} de cobre (Tabla XI), de forma que la EC_{50} es ligeramente menor en relación a los cultivos que solo contienen cobre.

Discusión



El deterioro de los sistemas acuáticos a causa de numerosos y diversos agentes contaminantes es un problema actual. Se ha hecho evidente la necesidad de encontrar métodos adecuados para estudiar la toxicidad de este tipo de sustancias. Las algas han sido utilizadas como indicadores biológicos en numerosos estudios de toxicidad (Wong & Beaver, 1980; Khan & Saifullah, 1986). La utilización de las microalgas como bioindicadores ambientales puede explicarse por el importante papel que éstas desempeñan como primer eslabón de la cadena trófica (Reynolds, 1984). Los efectos deletéreos producidos por determinados agentes contaminantes sobre las algas provocan serias consecuencias en el equilibrio del ecosistema, de modo que su utilización en bioensayos posee un gran valor en la estimación de la toxicidad de diferentes contaminantes (Couture *et al.*, 1985).

Las microalgas, como el resto de los microorganismos, sólo poseen una capacidad limitada para controlar su ambiente y responden a un cambio ambiental cambiando ellas mismas. Esta variabilidad suele implicar solamente uno o más cambios cuantitativos en algún componente celular, y sólo en casos drásticos se produce un cambio cualitativo radical en la estructura de la célula o su función. Por tanto, un microorganismo es en gran parte producto de su medio, por lo que carece de sentido hablar de su composición química, tasa de crecimiento y actividad fisiológica sin especificar al mismo tiempo las condiciones ambientales que la producen.

El metal elegido para llevar a cabo el presente estudio ha sido el cobre porque presenta características de elemento esencial y tóxico; además el cobre es uno de los metales contaminantes más abundantes en zonas costeras y de estuario. El cobre es un elemento traza esencial en el metabolismo celular de las algas (Manatran & Smith, 1973; Sorentino, 1979), pero en cantidades elevadas es uno de los elementos más tóxicos para las microalgas, y se utiliza como algicida (Hollibaugh *et al.*, 1980). En general, se acepta que el ión cúprico es el más tóxico de entre las diferentes especies químicas de cobre que existen en el medio acuático (Sunda & Guillard, 1976; Anderson & Morel, 1978; Rueter & McCarthy, 1979; Pagenkopf *et al.*, 1979; Sunda & Gillespie, 1979).

De todos los parámetros posibles que puedan indicar un efecto tóxico de los agentes contaminantes sobre los microorganismos, el crecimiento es el más estudiado. El efecto de los metales pesados sobre el crecimiento ha sido estudiado en un amplísimo tipo de organismos.

A concentraciones superiores a las requeridas el cobre inhibe el crecimiento de las microalgas (Gächter, 1976; O'Kelley, 1974; Thomas *et al.*, 1977; Gupta & Arora, 1978; Whittaker, 1978; Steeman-Nielsen & Kamp-Nielsen, 1970; Saifullah, 1978; Mandeli, 1969; Barlett *et al.*, 1974; Jensen *et al.*, 1976), reduciéndolo o deteniéndolo por completo, probablemente como resultado de una inhibición de la citoquinesis (Kanawaza & Kanawaza, 1969).

Los resultados obtenidos en el presente estudio ponen de manifiesto que existe una clara relación entre la concentración de cobre que resulta tóxica para las células y la densidad celular en el momento en que se introduce el agente contaminante al medio, en este caso el cobre; es por ello que para establecer comparaciones entre las distintas concentraciones que producen efectos sobre el crecimiento de las células resulta imprescindible conocer no sólo el tiempo de exposición al agente al que se han visto sometidas éstas, sino también la densidad celular a la que se ha realizado el ensayo.

En nuestro trabajo se ha observado que con tiempos de exposición relativamente cortos (48 horas) de las células al cobre, la relación entre la concentración que produce una reducción del 50% del crecimiento y la densidad celular inicial del cultivo sobre el que se actúa es lineal, mientras que con tiempos de exposición mayores (96 horas), esta linealidad desaparece a densidades celulares altas (48×10^4 células ml^{-1}) (Fig. 12). Sin embargo, aunque exista esta linealidad entre la EC_{50} de cobre sobre el crecimiento y la densidad celular inicial de los cultivos, la cuota celular o cantidad de cobre por célula necesaria para producir esta reducción del 50% del crecimiento, no es constante. Así, por ejemplo, utilizando densidades celulares iniciales de 6 y 12×10^4 células ml^{-1} , se obtienen EC_{50} para el crecimiento a las 96 horas de 44 y 131 mg l^{-1} de cobre, respectivamente (Fig.8, Tabla III).

En los ensayos de toxicidad de cualquier agente, el inóculo o número de células al comienzo del test debe adaptarse a los ensayos que se van a desarrollar

(Hörnström, 1990). Sin embargo, en los diseños experimentales de la mayoría de los trabajos publicados acerca de la toxicidad de metales sobre la fisiología de las microalgas marinas este hecho no se tiene en cuenta. En la mayoría de estos trabajos se utilizan unas densidades celulares iniciales muy bajas para el estudio del efecto de los metales sobre el crecimiento. Nuestros resultados demuestran que densidades celulares iniciales demasiado bajas limitan el crecimiento y favorecen el efecto tóxico de los metales sobre el crecimiento de la población microalgal.

Como se ha dicho anteriormente, el crecimiento es el parámetro más utilizado en los estudios de toxicidad en microalgas, pero también se estudian otros parámetros fisiológicos, como pueden ser la fotosíntesis o la respiración, y para ello se necesita un elevado número de células. Generalmente, en este tipo de estudios se recurre a cultivos más densos que, según demuestran los resultados obtenidos en este estudio, disminuyen el efecto tóxico del metal. De manera que aún utilizando las mismas concentraciones de metal, cuando no se utilizan densidades celulares homogéneas en todos los estudios, se están alterando los resultados de toxicidad del mismo y, por tanto, los valores o concentraciones de metal que inhiben el crecimiento y los que afectan a otro parámetro diferente no son comparables.

En función de los resultados que hemos obtenido se han establecido las condiciones de los cultivos para llevar a cabo los siguientes ensayos; asimismo, la densidad celular inicial se estableció en 24×10^4 células ml^{-1} , ya que densidades celulares menores aumentan el efecto tóxico del cobre disminuyendo el crecimiento, mientras que densidades celulares superiores se pierde la linearidad existente entre la concentración cobre que inhibe un 50% el crecimiento a las 48 y 96 horas, que son las fracciones de tiempo que habitualmente se utilizan en este tipo de trabajos.

Existe abundante bibliografía respecto a las concentraciones de distintos metales pesados que resultan inhibitorios para el crecimiento de diferentes especies de microalgas. En una revisión llevada a cabo por Sathya & Balakrishnam (1988) aparecen numerosas concentraciones de cadmio que afectan el crecimiento de diferentes especies microalgales: los cultivos de *Chlorella pyrenoidosa* detie-

nen su crecimiento con 5 mM de cadmio; en el caso de *Scenedesmus obliquus* y *Ankistrodesmus falcatus* se necesitan 5 mg l⁻¹; 10 mg l⁻¹ para los cultivos de *Chlorococcum sp.*; 1 mg l⁻¹ para otra especie de *Chlorella*; 1 mg l⁻¹ de cadmio inhiben el crecimiento, fotosíntesis y respiración de *Cylindrotheca closterium*. En ningún caso se especifican las condiciones del ensayo, de modo que, las diferencias de comportamiento entre especies no deben entenderse de manera literal, ya que habrá que sumarle las diferencias debidas al método.

Wong & Chang (1991) determinan que 0.25 mg l⁻¹ de cobre inhiben el crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa* en una suspensión de células con una absorbancia a 650 nm igual a 0.05, mientras Stauber & Florence (1987) obtienen para la misma especie microalgal una EC₅₀ para el crecimiento de 7.9 x10⁻⁷ M de cobre iónico, que es aproximadamente la quinta parte de la concentración de cobre propuesta por Wong & Chang (1991). En este último trabajo (Stauber & Florence, 1987), se analiza además el efecto del cobre sobre el crecimiento de otras dos especies de microalgas, *Nitzschia closterium* y *Asterionella gracilis*; en estas especies se inhibe el crecimiento a concentraciones de cobre de 27.8 x10⁻⁷ M y 16.5 x10⁻⁷ M, respectivamente.

Nuestros resultados muestran que 0.208 y 0.231 mg l⁻¹ de cobre reducen un 50% el crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* a las 96 y 48 horas, respectivamente, con un inóculo de 24 x10⁴ células ml⁻¹. Estos valores son ligeramente superiores a los obtenidos por Stauber & Florence (1987) a las 96 horas de exposición a cobre iónico de otras dos especies de diatomeas marinas, si bien no se conocen las densidades celulares utilizadas por estos autores.

Se han propuesto numerosos argumentos para explicar por qué el cobre inhibe el crecimiento de las microalgas. Posiblemente el cobre interfiere en el metabolismo del silicio de las microalgas. La incorporación de silicio por las diatomeas parece estar regulada por grupos -SH de enzimas de la superficie celular, como pueden ser las ATPasas, puesto que cuando estos grupos -SH están ligados a otros componentes se produce un descenso en la incorporación de sílice (Thomas *et al.*, 1980). El cobre presenta una elevada afinidad por los grupos sulfidrilos, lo que sugiere una posible inhibición de la incorporación de este elemento esencial para el frústulo de las diatomeas, como *Phaeodactylum*

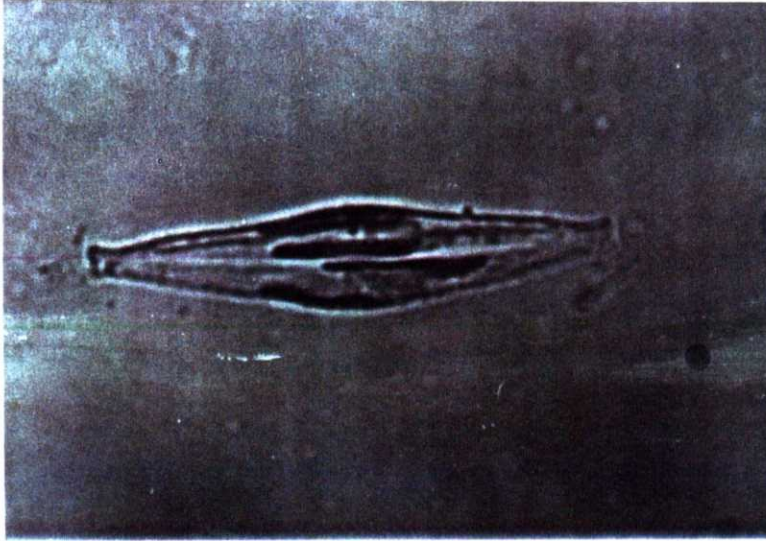


Foto 2.- Microfotografías de células aberrantes de *P. tricornutum* causadas por la presencia de cobre en el medio, realizada en un microscopio de contraste de fases con un objetivo de 100x.

tricornutum, o bien la cuota de sílice por célula no es suficiente como para que se lleve a cabo la división celular, provocando la aparición de formas aberrantes, como las que se han encontrado en el presente estudio (Foto 2). Estas formas aberrantes consisten en células en las que la división no ha llegado a su fin, las células hijas no se separan. Aparecen después del primer ciclo celular y son más abundantes en los cultivos con concentraciones de cobre iguales o superiores a 0.5 mg l^{-1} .

El hecho de que el cobre se una a los grupos -SH de las enzimas, puede llegar a bloquear muchos procesos celulares que conduzcan en último término a una inhibición del crecimiento. Florence & Stauber (1986) han encontrado que el cobre se une particularmente a la glutatión reductasa, lo que conduce a un descenso de la relación existente entre glutatión reducido y glutatión oxidado que podría inhibir el crecimiento.

El crecimiento de los microorganismos es un complejo proceso que incluye la síntesis de proteínas, ARN y ADN, que generalmente culmina con la división

celular; el comienzo de la replicación del ADN se ve afectado por las condiciones del medio en que se desarrollan las células (Moriarty, 1984). Al contrario de lo que sucede en bacterias, en los organismos eucariotas no se sintetiza ADN continuamente durante todo el ciclo de crecimiento celular, ya que esta síntesis sólo se produce en un momento puntual del mismo. La síntesis de ADN en eucariotas depende de una síntesis continua de proteínas y la replicación se detiene si esta síntesis proteica se detiene. La síntesis de ADN nuclear en microalgas se lleva a cabo durante el período de oscuridad cuando los cultivos están sincronizados (Clay *et al.*, 1975; Harris, 1988).

La asimilación e incorporación de metil-³H-timidina se ha utilizado como medida de la síntesis de ADN en bacterias. Aunque pocos, también existen datos acerca de la asimilación de timidina tritiada por algas eucariotas, protozoos, levaduras y otros hongos, recogidos por Karl (1982). Recientemente, se ha demostrado que las microalgas eucariotas dentro de poblaciones mixtas de microorganismos incorporan ³H-timidina (Rivkin, 1986, citado en Karl, 1986; Tubbing & Admiraal, 1991a). Este método permite estudiar de un modo indirecto pero muy rápido la síntesis de ácidos nucleicos en los microorganismos, como base para el crecimiento celular.

Teniendo en cuenta los resultados que hemos obtenido mediante el estudio de la incorporación de ³H-timidina, la concentración de cobre presente en el medio afecta la síntesis de ácidos nucleicos de la diatomea *P. tricornutum* (Fig. 13). En los cultivos con las concentraciones de cobre más altas ensayadas la incorporación de timidina radiactiva es prácticamente nula (Fig. 13), coincidiendo con los cultivos que presentan una tasa de crecimiento próxima a 0 (Fig. 8).

La tasa de crecimiento de *P. tricornutum* a las 24 horas de exposición al cobre y la tasa de incorporación de ³H-timidina después de 12 horas de exposición al cobre son directamente proporcionales como se observa en la figura 50, con un coeficiente de correlación de 0.928. Para el presente estudio hemos utilizado [6-³H]-timidina, por lo que al metabolizarse el marcaje radiactivo puede dirigirse tanto al ADN como al ARN, pero si tenemos en cuenta la correlación existente entre la tasa de crecimiento y la tasa de incorporación de timidina, probablemente la mayor parte de la timidina incorporada pase a formar parte del ADN; a esto

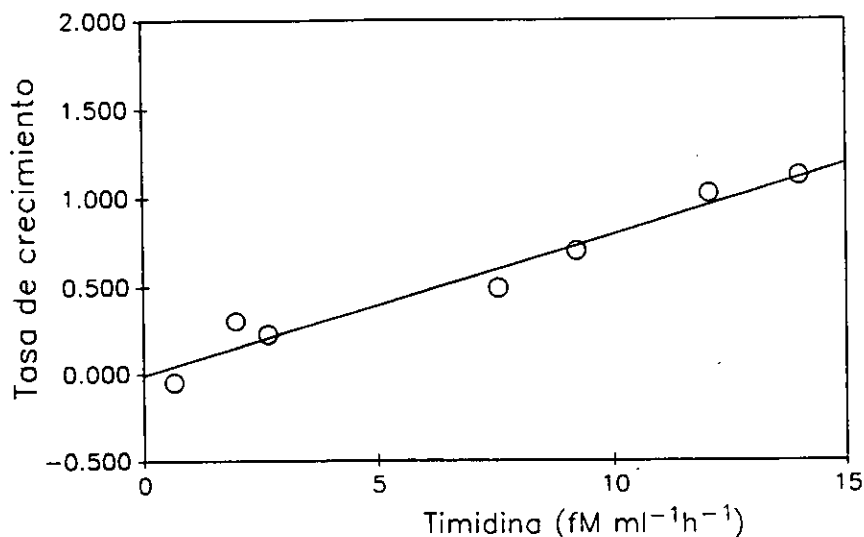


Figura 50.- Relación entre la tasa de incorporación de ^3H -timidina, expresada en $\text{fM ml}^{-1} \text{h}^{-1}$, y la tasa de crecimiento a las 24 horas de exposición al cobre, expresada en doblajes día $^{-1}$, en los cultivos de *Phaeodactylum tricornerum* con diferentes concentraciones de cobre en el medio.

habría que añadir el hecho de que la timidina se añade justo antes del inicio de la fase de oscuridad en la que va a producirse la síntesis de ADN nuclear en cultivos sincronizados de microalgas (Clay *et al.*, 1975; Harris, 1988).

Uno de los efectos tóxicos más conocidos del cobre sobre las microalgas es el que éste ejerce sobre la fotosíntesis. Las concentraciones de cobre que inhiben la fotosíntesis son muy variables y dependen, como en el caso del crecimiento, de la especie ensayada, las condiciones del estudio, etc. Wong & Chang (1991) encuentran que 0.1 mg l^{-1} de cobre inhiben ligeramente la fotosíntesis en *Chlorella pyrenoidosa*, y se necesitan 0.25 mg l^{-1} para inhibirla completamente. Stauber & Florence (1987) observan que en el caso de *Nitzschia closterium* son necesarias concentraciones de cobre superiores a 0.1 mg l^{-1} para inhibir la fotosíntesis.

Las razones por las cuales el cobre inhibe la fotosíntesis son varias. Algunos metales provocan una disminución de la síntesis de clorofila *a* (Ilangoan *et al.*, 1992); además el cobre inhibe la fotosíntesis disminuyendo el transporte electro-

nico fotosintético, ya que puede interferir en el fotosistema I (PS I) a nivel de la ferredoxina (Shioi *et al.*, 1978) y en el fotosistema II (PSII) (Singh & Singh, 1987).

La EC_{50} de cobre sobre la fotosíntesis, después de 8 horas de luz y exposición al metal en cultivos de *P. tricornutum* con una densidad celular inicial de 24×10^4 células ml^{-1} , es 0.405 mg l^{-1} (Tabla IV), mientras que las EC_{50} para el crecimiento a las 48 y a las 96 horas de exposición al cobre son 0.231 y 0.208 mg l^{-1} de cobre, respectivamente (Fig. 12). A la vista de estos datos se puede indicar que el efecto inhibitorio sobre el crecimiento es mayor que el efecto producido sobre la fotosíntesis, ya que la concentración de cobre necesaria para inhibir el crecimiento es menor que la necesaria para inhibir la fotosíntesis, estimando el 50% de ambos parámetros. Estos resultados concuerdan con los que aparecen en la bibliografía en los que se observa que aún habiéndose producido un efecto inhibitorio del crecimiento a causa del cobre, las células que no son capaces de dividirse pueden seguir realizando determinadas funciones metabólicas, como puede ser la fotosíntesis (Florence & Stauber, 1986; Stauber & Florence, 1987, 1990).

Sin embargo, en la mayoría de los estudios acerca de la toxicidad de los metales sobre diferentes parámetros fisiológicos de las especies ensayadas, las densidades celulares utilizadas para observar el efecto tóxico sobre el crecimiento y las utilizadas para estudiar el efecto sobre la fotosíntesis no son las mismas, lo que conlleva que las diferencias entre los dos parámetros analizados parezcan mayores, dado que se suman los efectos propios del cobre con los efectos que sobre el crecimiento ejerce la densidad celular inicial del cultivo. Otro aspecto a tener en cuenta a la hora de estudiar la fotosíntesis es la duración de las experiencias. Como se indicó anteriormente, la concentración de cobre requerida para inhibir el crecimiento un 50% disminuye a medida que aumenta el tiempo de la experiencia, el tiempo de exposición al metal.

Por todo esto, parece necesario que la comparación de diferentes parámetros fisiológicos se lleve a cabo estudiando esas respuestas a tiempos de exposición al metal similares. Si tenemos en cuenta la EC_{50} sobre el crecimiento en el mínimo tiempo requerido para determinar este parámetro (24 horas), que es $667 \mu\text{g l}^{-1}$ de cobre, y la EC_{50} para la fotosíntesis durante las 12 horas que dura la experiencia, y cuyo valor es $405 \mu\text{g l}^{-1}$ de cobre, se observa que la fotosíntesis se inhibe en un

50% a concentraciones de cobre menores a las necesarias para reducir en la misma proporción el crecimiento de los cultivos de *P. tricornutum*.

El grado de inhibición de la fotosíntesis aumenta a medida que aumenta la concentración de cobre en el medio. Así, en los cultivos con la concentración de cobre más alta de las ensayadas (5 mg l⁻¹ de cobre) la asimilación de ¹⁴C-bicarbonato es prácticamente nula después de 4 horas de exposición al metal (Fig. 14).

La fotosíntesis constituye el proceso de producción de energía en las células vegetales. Esta energía generada se almacena en forma de ATP. Por lo tanto, cualquier agente que provoque una inhibición o alteración del proceso fotosintético, puede alterar la concentración de ATP en el interior de las células.

Nuestros resultados muestran una disminución de los niveles intracelulares de ATP como resultado de la exposición de las células de *P. tricornutum* a diferentes concentraciones de cobre (Fig. 16). Esta reducción puede ser una consecuencia de la inhibición en los sistemas de transporte electrónico, como la que se ha encontrado en células de *Chlorella vulgaris* en cultivos con zinc o con mercurio (Rai *et al.*, 1991).

La concentración intracelular de ATP cae drásticamente desde la menor concentración de cobre ensayada (0.025 mg l⁻¹), después de 8 horas de exposición al metal (Fig. 16). Por lo tanto, es mucho mayor la caída de la concentración intracelular de ATP que la de la fotosíntesis. Este hecho podría explicarse por un mayor consumo de ATP en el interior de la célula, además de reducirse su producción. Este aumento en el consumo de ATP puede ser debido a la necesidad por parte de la célula de evitar en lo posible los efectos tóxicos del cobre, manteniendo la integridad celular y activando determinados procesos metabólicos para mantener el crecimiento celular, que como se ha observado no se reduce hasta concentraciones de cobre mayores que las que reducen el contenido de ATP.

El estrés es capaz de inducir o acelerar numerosos cambios característicos de un proceso de envejecimiento. El estrés rompe la capacidad homeostática de las células (Davies & Sigeo, 1984; Gahan, 1984) e interfiere en los sistemas de

automantenimiento celular, no sólo produciendo lesiones, sino también inhibiendo su reparación y, posiblemente, elevando el coste energético de dicha reparación (Penning de Vries, 1975). El descenso en el contenido intracelular de ATP observado (Fig. 16), podría ser un indicador de el elevado gasto energético que se produce como mecanismo de respuesta frente al estrés producido por el cobre.

Con el fin de estudiar más a fondo el metabolismo fotosintético de *Phaeodactylum tricornutum* se realiza el análisis de pigmentos de esta microalga sometida a diferentes concentraciones de cobre.

El análisis de pigmentos fotosintéticos de 51 diatomeas pertenecientes a 13 familias diferentes, concluye que todas ellas contienen clorofilas *a* y *c*, β -caroteno, fucoxantina, diadinoxantina y diatoxantina (Jeffrey & Stauber, 1985). Además, el carotenoide neofucoxantina y los derivados de la clorofila *a*, clorofilida *a*, alómero de la clorofila *a*, isómero de la clorofila *a* y la feofitina *a* aparecen en los cultivos de diatomeas (Mantoura & Llewellyn, 1983; Hallegraeff & Jeffrey, 1985; Klein, 1988; Wright *et al.*, 1991). La clorofila *a*, la clorofila *c*, la fucoxantina y, probablemente, el β -caroteno son pigmentos capaces de captar la energía de la luz (Jeffrey, 1980). Las funciones de los restantes pigmentos no se conocen bien; tal vez desempeñen un papel protector frente a la fotooxidación, algunos son intermediarios en la ruta de síntesis de algunos pigmentos (por ejemplo, la clorofilida *a*), y algunos son productos de degradación, como la feofitina *a* (Klein, 1988).

La composición de pigmentos de las diatomeas depende de factores ambientales, como la concentración de nutrientes, temperatura, intensidad de luz, longitud de onda y fotoperiodo (Shimura & Fujita, 1975; Beardal & Morris, 1976; Carreto & Cataggio, 1976; Humphrey, 1979, 1983; Jeffrey, 1980; Gallagher *et al.*, 1984).

La concentración de diadinoxantina y de diatoxantina aumenta con la edad de los cultivos en las diatomeas *Navicula salinarum* y *Nitzschia closterium* (Klein, 1988). Este autor señala, asimismo, que el alómero de la clorofila *a* sigue el mismo patrón de concentración de la clorofila *a*, decreciendo con el tiempo. El proceso de alomerización consiste en la oxidación de la clorofila a pH elevados.

Nuestros resultados muestran que el cobre altera el patrón de pigmentos de la diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum*. La proporción de clorofila *a* disminuye al aumentar la concentración de cobre, mientras que la proporción del alómero de la clorofila *a* aumenta (Fig.17).

Messer & Ben-Shaul (1972), Lubián *et al.* (1986) y Klein (1988) observan que la concentración celular de todos los pigmentos sufre considerables variaciones durante el crecimiento exponencial.

Cuando no existe ningún factor estresante, la relación clorofila *a*: alómero de la clorofila *a* es menor durante los periodos de mayor crecimiento y aumenta cuando el crecimiento se detiene, lo que indica que una elevada concentración del alómero de la clorofila *a* está relacionado con un crecimiento activo (Klein, 1988). Sin embargo, en nuestros resultados se observa un descenso de esta relación entre clorofila *a* y alómero de la clorofila *a* al aumentar la concentración de cobre del medio, coincidiendo con las concentraciones de cobre que producen una mayor reducción de la tasa de crecimiento y de la tasa de fotosíntesis.

Además de los parámetros clásicos utilizados en los ensayos de biotoxicidad, determinamos el efecto tóxico del cobre sobre diferentes características celulares de *Phaeodactylum tricornutum*, estudiados en células individuales mediante la técnica de citometría de flujo (CMF).

Entre la bibliografía revisada acerca de la metodología empleada para la detección de cambios morfológicos en células microalgales afectadas por metales pesados sólo se han encontrado técnicas de microscopía, tanto óptica como electrónica. La citometría de flujo permite el análisis rápido de características estructurales de las células analizadas. Las características estructurales que se pueden analizar por citometría de flujo sin necesidad de teñir las células ni de someterlas a ningún tratamiento especial son volumen y granularidad celular.

Varios autores han observado un aumento del volumen celular en diferentes especies de microalgas expuestas a elevadas concentraciones de diferentes metales pesados, coincidiendo con lo observado en el presente estudio para la diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum* por efecto de concentraciones

elevadas de cobre (Figs. 21 y 22). Stauber & Florence (1987) observan cambios morfológicos en células de la diatomea *Nitzschia closterium* afectadas por cobre, que incluyen un aumento en su volumen celular, así como otros cambios estructurales. Stokes *et al.* (1973) también observan un aumento de tamaño en células de *Chlorella* y *Scenedesmus*; estas células de gran tamaño se dividen y recuperan su tamaño normal al ser transferidas a un medio libre de cobre. Bolaños *et al.* (1992) utilizando un microscopio electrónico de transmisión, observan un importante deterioro y aumento de tamaño de células de la cianobacteria *Anabaena* después de 96 horas de exposición a 1.5 mg l^{-1} de cadmio.

El cobre afecta a los mecanismos de regulación del volumen celular (Riisgard *et al.*, 1980), posiblemente incrementando la permeabilidad al Na^+ o reduciendo la permeabilidad al K^+ y/o al Cl^- . Este hecho explicaría el incremento inmediato de volumen observado tras la adición de cobre al cultivo de *P. tricornutum*, si bien es necesaria la adición de una importante cantidad de cobre para observar dicho efecto (10 mg l^{-1} de cobre) (Fig. 21).

Además del aumento de tamaño, las células de *P. tricornutum* expuestas a cobre presentan ciertos cambios a nivel ultraestructural, o lo que se puede denominar complejidad interna celular. A las 96 horas de exposición a concentraciones de cobre iguales o superiores a 1 mg l^{-1} , la complejidad interna de las células es mayor que a las 8 horas de exposición al cobre (Figs. 23 y 24). Inmediatamente después de la adición del cobre no se observan cambios a este nivel.

Una revisión de Smith (1983) acerca de los efectos del cobre en el nivel ultraestructural de las diatomeas señala que *Ditylum brightwellii* expuesta a 0.3 mg l^{-1} de cobre presenta, además de un aumento del volumen celular, el protoplasto alejado de la pared celular y los cloroplastos concentrados en un grupo (Cantenford, 1980). Análisis morfométricos de la cianobacteria *Plectonema boryanum* expuesta a cobre revelan un incremento en el volumen celular acompañado de otras alteraciones en el interior de la célula como un descenso del área superficial en los tilacoides, un marcado descenso en el volumen de las inclusiones lipídicas y la aparición de cuerpos granulares electrondensos (Rachlin *et al.*, 1982b).

Diatoma tenue var. *elongatum* incorpora cobre en los cuerpos polifosfatados (Sicko-Goad & Stoermer, 1979). En la diatomea *Amphora veneta* se observaron cuerpos polifosfatados que contenían, además de fósforo, calcio y cobre dentro de las vacuolas, pero además se encontraron "cuerpos cúpricos" asociados a membranas, que contenían azufre, calcio y cobre (Daniel & Chamberlain, 1981). Silverberg *et al.*, (1976) encuentran que cepas tolerantes de *Scenedesmus* ligan cobre en el núcleo a concentraciones que son letales para cepas no tolerantes. El aumento de la complejidad celular también puede deberse a un aumento del número o tamaño de las vacuolas, que tienen como finalidad excretar el metal que está entrando en exceso al interior celular (Sicko-Goad, 1982).

Estos cambios ultraestructurales citados producen en último término un aumento de la complejidad celular similar al que hemos observado en nuestros resultados, si bien no podemos establecer a qué mecanismo o mecanismos celulares concretos se debe el aumento de la complejidad que hemos detectado.

Otro parámetro celular que puede determinarse por CMF sin necesidad de utilizar fluorocromo alguno es la autofluorescencia natural de las células, como la existente en las células microalgales.

Existen algunos estudios acerca del posible efecto tóxico de diferentes contaminantes sobre la fluorescencia de las células algales (Moody *et al.*, 1983). Samson & Popovic (1988) utilizan una medida indirecta de la fluorescencia de la clorofila *a* (el área complementaria de la cinética de la fluorescencia) como posible indicador de los efectos tóxicos de los metales pesados cobre y mercurio y de diversos insecticidas y herbicidas, sobre la microalga marina *Dunaliella tertiolecta*; este área complementaria decrece cuando la concentración de cobre aumenta. En ninguno de estos estudios se utiliza la técnica de CMF.

El estudio de las reacciones de la cadena de transporte electrónico es difícil en células microalgales intactas ya que los aceptores o donadores exógenos penetran muy difícilmente en ellas. Sin embargo, las medidas de la fluorescencia de la clorofila *a* en células intactas proporcionan información acerca de la absorción, distribución y utilización de la energía en la fotosíntesis (Papageorgiou, 1975, citado en Murthy *et al.*, 1990). La fluorescencia de la clorofila *a* es particu-

laramente sensible al funcionamiento del fotosistema II. Los cambios de fluorescencia de la clorofila *a* a temperatura ambiente están principalmente asociados con la actividad del fotosistema II (PS II), y reflejan el estado redox del aceptor primario de electrones del PS II, la Q_A (Murthy *et al.*, 1990). Cualquier inhibición del flujo de electrones del centro de reacción del PS II desde el lado del donador disminuye la fluorescencia de la clorofila *a*, mientras que el bloqueo del lado del aceptor del PS II la incrementa (Butler, 1977; Samson *et al.*, 1988; Murthy *et al.*, 1990).

Xu *et al.* (1990) han observado que la fluorescencia de la clorofila *a* detectada en un citómetro de flujo con un solo láser de excitación a 488 nm se corresponde con la fluorescencia máxima (F_{max}) cuando los centros de reacción del PS II están cerrados en el estado Q_A ; este estado se alcanza en condiciones de elevada intensidad de luz. En nuestros resultados se observa un incremento de la fluorescencia de la clorofila *a* detectada por citometría de flujo de células de *P. tricornutum* afectadas con diferentes concentraciones de cobre (Fig. 26). Este hecho podría explicarse por un bloqueo, por efecto del cobre, de la cadena de transporte electrónico a nivel del PS II, tal como postulan Singh & Singh (1987) y Samson *et al.* (1988). Murthy *et al.* (1990) también han observado este bloqueo del PS II por la acción del mercurio, en células de la cianobacteria *Spirulina platensis*.

Este bloqueo de la cadena de transporte electrónico a nivel del PS II puede relacionarse con la disminución de la tasa de fotosíntesis y de la concentración intracelular de ATP que hemos observado en las células de *P. tricornutum* cuando se adicionan elevadas concentraciones de cobre al agua de mar.

Como hemos dicho anteriormente, el cobre produce un aumento del volumen celular y las células más grandes presentan una mayor fluorescencia (Fig. 27); estas células más grandes y más fluorescentes se observan a elevadas concentraciones de cobre en el medio, concentraciones que producen la mayor inhibición del crecimiento. Aunque el crecimiento esté inhibido, podría ocurrir que la síntesis de clorofila *a* no se viese afectada; sin embargo, la proporción de clorofila *a* en estas células es menor como hemos observado por el análisis de pigmentos por HPLC (Fig. 17). Otros autores han observado que la cantidad de clorofila *a* por célula disminuye por efecto del cadmio (Bolaños *et al.*, 1992). Por

lo tanto, podemos decir que el aumento de la autofluorescencia se produce por efecto del cobre a nivel del PS II y no por un aumento en la concentración de clorofila *a* en la célula.

El estrés es capaz de inducir o acelerar numerosos cambios característicos de un proceso de envejecimiento. Cantidades extremas del agente estresante matan rápidamente las células de la planta u órgano afectado, mientras que concentraciones subletales parecen acelerar los procesos de envejecimiento celular (Noodén, 1988). El efecto más grave del estrés (tanto agudo como crónico) y del proceso de senescencia celular es el daño causado sobre la membrana celular, ya que conlleva una pérdida irreversible de la homeostasis celular (Cooper, 1981; Pegg, 1981; Thompson, 1974). En el presente estudio, se ha observado que concentraciones de cobre iguales o superiores a 1 mg l^{-1} inducen daños irreversibles a nivel de la membrana plasmática en células de *P. tricornutum*, que se observan en el descenso del número de células viables estudiado mediante la tinción de las células dañadas con yoduro de propidio (Tabla VI; Fig. 28). El número de células no viables, cuya membrana celular ha perdido la integridad, aumenta con la concentración de cobre del medio y con el tiempo de exposición al metal (Tabla VI; Fig. 28).

Las membranas celulares son barreras selectivas y dinámicas que juegan un importante papel en la regulación de muchos procesos bioquímicos y fisiológicos. Durante el envejecimiento celular se produce una pérdida progresiva de la integridad de la membrana. Tal vez éste es el más evidente de los efectos de tipo ultraestructural que llevan al deterioro de los orgánulos celulares y la membrana. Se produce una pérdida progresiva de las propiedades funcionales y de la integridad estructural (Thompson, 1988).

El envejecimiento celular es un proceso activo que se inicia por la combinación de factores internos y ambientales, y el deterioro de la membrana es una característica fundamental de este proceso. El proceso de envejecimiento es diferente según el tipo de membrana; por ejemplo, el envejecimiento de la membrana de la fracción microsomal (membrana plasmática, retículo endoplasmático y membrana de las vacuolas) es diferente al que sufren las

membranas especializadas de los tilacoides de los cloroplastos (McRae & Thompson, 1985).

Los ácidos grasos insaturados son el componente mayoritario de la bicapa lipídica de las membranas y son muy sensibles a los ataques de los radicales libres. Las consecuencias del ataque de los radicales libres a las membranas son numerosas e incluyen la peroxidación de los lípidos (Kellog & Fridovich, 1975), la lisis (Goldstein & Weissmann, 1977) y la desesterificación de los ácidos grasos (Niehaus, 1978). La formación de radicales superóxido en las membranas microsomales envejecidas se ha atribuido a una lipoxigenasa asociada a membrana y, además, algunos autores implican a las lipasas en el deterioro de la membrana (Thompson, 1988). Los radicales superóxido facilitan la desesterificación de los ácidos grasos de los fosfolípidos (Niehaus, 1978) y, unido a la producción de estos radicales por la lipoxigenasa asociada a membrana, contribuyen a la rotura de los fosfolípidos.

En células envejecidas de plantas superiores se ha observado que la relación entre esteroides y fosfolípidos aumenta y el aumento de los esteroides frente a los fosfolípidos reduce la fluidez de la bicapa (Shinitzky, 1984), lo que facilitaría la rotura de la membrana. Dhindsa *et al.* (1981) encuentran una correlación entre la peroxidación de los lípidos y el aumento de la permeabilidad de la membrana en los tejidos envejecidos de hojas.

Los metales de transición se pueden considerar como radicales ya que presentan uno o más electrones desapareados. Debido a esto, pueden reaccionar con el oxígeno para inducir, por ejemplo, la producción de peligrosos radicales libres (superóxido o hidroxilo), que pueden reaccionar con algunas biomoléculas, principalmente lipoproteínas, causando un fenómeno de peroxidación, que es especialmente evidente en las membranas lipídicas (Pisanti *et al.*, 1988).

La actividad peroxidasa ha sido uno de los parámetros estudiados que presenta un mayor grado de variabilidad a lo largo del tiempo (Fig. 29). Sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos se puede decir que cuando la actividad peroxidasa aumenta (cultivos con 1, 2.5 y 5 mg l⁻¹ de cobre a las 96 horas de exposición al metal) la viabilidad celular disminuye. Este hecho muestra que

la actividad peroxidasa detectada está directamente relacionada con la desaparición de la integridad de la membrana celular, lo que conduce a la muerte celular.

Entre los metales de transición, el cobre es muy reactivo y puede provocar la formación de peróxidos y radicales libres de oxígeno, ya que puede llegar a presentar cierta "actividad" superóxido dismutasa, que lleva a la formación de peróxido de hidrógeno a partir de radicales superóxido O_2^- (Florence & Stauber, 1986). Además, el cobre puede reducir los mecanismos de defensa contra estos radicales, debido a la inhibición de la catalasa, como consecuencia del desplazamiento del hierro de su centro activo. Todos estos radicales podrían acelerar la degradación oxidativa de los lípidos de membrana.

Nuestros resultados muestran que aquellas concentraciones de cobre que producen un aumento de la actividad peroxidasa (Fig. 29) también producen un descenso de la viabilidad celular (Fig. 28), lo que indica que ambos parámetros se encuentran relacionados.

Los organismos unicelulares se encuentran en contacto directo con el medio que los rodea, separados únicamente por una membrana y, en determinados casos, por una pared celular. Por tanto, cualquier alteración que se produzca en el medio los va a afectar directamente y la primera respuesta celular frente a la perturbación ambiental va a producirse a nivel de la membrana plasmática.

Inmediatamente después de la adición de elevadas concentraciones de cobre al medio se produce una hiperpolarización de la membrana plasmática (Tabla VII, Fig. 31). Después de 96 horas de exposición a concentraciones de cobre iguales o superiores a 0.10 mg l^{-1} presentan potenciales de membrana superiores a los de las células control (sin cobre) (Fig. 32). El potencial de membrana mitocondrial también aumenta por efecto de la concentración de cobre del medio (Fig. 33). Varias respuestas citológicas indican la sensibilidad de las membranas fotosintéticas y mitocondriales al cobre, y se recogen en los estudios de Rachlin *et al.* (1982b), dónde el cobre fue el único entre 8 metales pesados ensayados que causaba una marcada reducción en el contenido celular en lípidos. Estos estudios confirman las experiencias de Sandmann & Boger (1980a), dónde el cobre induce

daños de membrana en *Scenedesmus acutus*, y apoya su modelo de reacciones de peroxidación en lípidos inducidas por cobre (Sandmann & Boger, 1980b).

Cada vez existen más evidencias de que los cambios en el pH citoplasmático juegan el papel de mensajero secundario en los sistemas animales (Frelin *et al.*, 1988), pero en vegetales la información es muy débil y escasa (Felle, 1989).

En el alga *Eremosphaera viridis* la acidificación del citoplasma induce un aumento en la conductividad de los canales de K^+ (Köhler *et al.*, 1986; Steigner *et al.*, 1988). Esto sugiere que en las células vegetales, como en las células animales excitables, el pH intracelular modifica las propiedades de los canales iónicos (Moody, 1984), y juega un importante papel en la transducción de señales desde los fotosistemas en los cloroplastos a los canales de K^+ en las membranas.

Cambios en el pH citoplasmático y en el Ca^{2+} citosólico suelen ir asociados en las células animales, pero en vegetales existen muy pocos trabajos acerca de esta variación conjunta, ya que el Ca^{2+} es muy difícil de medir en este tipo de células (Kurkdjian & Guern, 1989).

El pH intracelular puede afectar a las tasas de asimilación de metales; así, la entrada de Sr^{+2} en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* desciende con el aumento del pH_i (Roomans *et al.*, 1979).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran un aumento inmediato del pH_i en las células de *Phaeodactylum tricornutum* tras la adición de elevadas concentraciones de cobre (Fig. 34, Tabla VIII). Las células afectadas por el cobre después de una exposición larga al metal presentan, asimismo, un mayor pH intracelular (Fig. 35).

Como se ha dicho anteriormente, la alomerización de la clorofila se produce cuando el pH intracelular es elevado. Las células expuestas a concentraciones de cobre iguales o superiores a 0.5 mg l^{-1} durante 24 horas presentan un notable aumento de la proporción del alómero de la clorofila *a* frente a la proporción de clorofila *a*, y la proporción de alómero es superior al de la clorofila *a* a partir de 1 mg l^{-1} de cobre (Fig. 17). Los cultivos con una concentración de cobre igual o

superior a 0.25 mg l^{-1} presentan un importante aumento del pH intracelular a las 24 horas de exposición al metal frente a las células de los cultivos control (Fig. 35).

Las alteraciones fisiológicas y citológicas que hemos visto se producen como consecuencia de la entrada de cobre al interior de la célula. Las células son capaces de adsorber metales en su superficie celular, pero una fracción de este metal penetra en la célula y sólo una pequeña cantidad puede ser atrapada de forma inactiva, por ejemplo unido a fitoquelatinas. El exceso de cobre que penetra en la célula es el responsable de todas las alteraciones que hemos visto hasta el momento.

La acumulación de metales traza y sus radioisótopos por microalgas planctónicas ha sido objeto de numerosos estudios, que muestran que las algas unicelulares pueden captar elevadas concentraciones de metales pesados (Nakajima *et al.*, 1981; Reed & Gadd, 1988). Dos son los mecanismos principales mediante los cuales pueden ejercer este proceso: la acumulación intracelular (bioacumulación) y la unión de los metales a superficies celulares (bioadsorción).

La incorporación de metales por las microalgas es un proceso que se lleva a cabo en dos fases: una fase rápida, independiente del metabolismo, que consiste en la unión del metal a la superficie celular; y una fase más lenta de incorporación al interior de la célula que se debe al efecto simultáneo de la incorporación activa y la difusión pasiva del metal (Garnham *et al.*, 1992)

Una de las principales características de la mayoría de los microorganismos (bacterias, hongos y microalgas) que los diferencia de las células animales, es la presencia de pared celular, que constituye una barrera externa definida, que se sitúa exteriormente a la membrana citoplasmática celular. La pared protege a los microorganismos frente a las condiciones ambientales, controla los flujos existentes entre el citoplasma y el medio que rodea a la célula y determina la forma y la rigidez celular. Dado que está directamente relacionada con el medio, interactúa con las sustancias solubles de éste; esta interacción puede ser particularmente pronunciada en el caso de los iones metálicos, debido a las características aniónicas de la pared celular (Remacle, 1990).

Las superficies celulares de las microalgas juegan un importante papel en la retirada de los metales pesados (Sigg, 1987; Whitfield & Turner, 1987). Las microalgas presentan amplias áreas superficiales con una alta afinidad por estos agentes. Las paredes celulares microalgales tienen numerosos poros en su estructura que permiten que tanto las moléculas como los iones las atraviesen (Kuyucak & Volesky, 1990).

El cobre, en particular, es un metal que muestra una elevada afinidad por los grupos funcionales de la superficie de las microalgas, con altas constantes de formación de complejos (Xue *et al.*, 1988). Las células microalgales poseen en su superficie varios grupos funcionales: carboxilo, amino, tio, hidroxilo e hidroxycarboxílico, que pueden interactuar con los iones metálicos (Xue *et al.*, 1988) formando complejos de elevada estabilidad. Peterson *et al.* (1975) han calculado que la diatomea *Phaeodactylum* posee 6.7×10^8 lugares en su superficie celular para ligar átomos de plomo.

Estos hechos permiten explicar por qué la mayor parte del cobre se encuentra ligado a la superficie microalgal, siendo éste uno de los mecanismos más importantes de defensa que presentan estos microorganismos contra la contaminación por éste y otros metales pesados que se encuentren en el medio. En el presente estudio la diatomea marina *P. tricornutum* llegó a retirar un 65% del cobre añadido, del cual más del 90% aparece como cobre adsorbido (Tablas IX y X).

Sin embargo, a pesar de este mecanismo, cierta cantidad de cobre se incorpora al interior de la célula, ya que éste es un elemento esencial para la fisiología celular, pero cuando su concentración intracelular se eleva por encima de un determinado umbral comienza a ejercer su toxicidad. La concentración intracelular de cobre se satura a $0.037 \text{ mg} \times 10^{-6} \text{ célula}^{-1}$ (Tabla IX; Fig. 37), lo que indica que la cantidad de cobre que provoca los efectos tóxicos a nivel celular es mínima. Por esta razón, a medida que aumenta el cobre intracelular se observa un descenso de la tasa de crecimiento. La retirada de metales tóxicos del medio por quelación de los iones metálicos, muestra una fuerte correlación entre la tasa de crecimiento microalgal y la concentración de cobre iónico libre en el medio (Morel & Morgan, 1972). Numerosos autores han encontrado que cuando aumenta la

asimilación y acumulación intracelular de un metal, disminuye el crecimiento (Coleman *et al.*, 1971; Kuyucak & Volesky, 1990). En los resultados obtenidos en este estudio, se observa que las células que acumulan más cobre son las que se cultivan en un medio con una cantidad elevada de cobre y presentan una mínima tasa de crecimiento.

El aumento en la cantidad de cobre intracelular está en relación con el hecho de que no todo el cobre puede ser retirado por adsorción, estableciéndose un equilibrio entre las tres fracciones: cobre extracelular, cobre adsorbido y cobre intracelular. Cuando se alcanza el nivel de saturación de los ligandos extracelulares, se produce la entrada de cobre al interior de la célula hasta que de nuevo se produzca la saturación, que se alcanza a niveles en los que la toxicidad es ya muy severa.

Todos estos mecanismos permiten a las células actuar como bioacumuladores, retirando del medio el metal que se encuentra en exceso (Kuyucak & Volesky, 1990). Esta capacidad de bioacumulación de las células será tanto mayor cuanto mayor sea su resistencia a la toxicidad por el metal, puesto que si el metal inhibe su crecimiento, las posibilidades de retirada son menores. Esto se puede observar en nuestros resultados en los que a las concentraciones más altas de cobre ensayadas se produce un descenso del porcentaje de cobre retirado, precisamente debido a que existe un menor número de células que puedan ejercer la función de retirada (Tabla X).

Hemos hablado del efecto producido por el cobre sobre la diatomea marina *Phaeodactylum tricorutum*. Pero en los sistemas naturales es imposible hablar del efecto de un único elemento en particular, ya que se producen interferencias o interacciones con distintos factores, entre los cuales destaca la presencia de otros iones metálicos en el medio.

Generalmente el lugar primario de acción de los metales tóxicos es la membrana celular (Passow *et al.*, 1961). El paso de cationes a través de la membrana está controlado por numerosos factores. Cuando un ión es absorbido rápidamente en la membrana plasmática, con un descenso simultáneo en la absorción de otro, este fenómeno recibe el nombre de competición. Debido a este

fenómeno, los iones pueden competir por los lugares de unión a metales en la membrana, o pueden ejercer efectos indirectos sobre procesos intracelulares de los que forman parte. La competición entre metales por los lugares de unión dentro del organismo es responsable de muchos de los efectos delétereos que provocan en los organismos.

Debido a que el crecimiento es uno de los parámetros más utilizados en ensayos de toxicidad, fue elegido para el estudio de interacciones metálicas entre el cobre y los metales zinc, hierro y cadmio.

Los efectos de las combinaciones de metales sobre las microalgas dependen de las especies ensayadas, las combinaciones metálicas utilizadas y el orden de introducción de los metales (Stratton & Corke, 1979). Se ha encontrado que las interacciones de los iones divalentes son más complejas que las de los monovalentes (Campbell & Lewis, 1988); por todo esto, las referencias existentes varían enormemente de unas especies microalgales a otras, e incluso dentro de una misma especie las relaciones entre metales pueden variar dependiendo del parámetro que se estudie.

Numerosos estudios de interacciones de metales pesados en microalgas están referidos a la mezcla de cobre con otros metales como cadmio, mercurio, níquel, zinc, etc. Otros factores que afectan a la toxicidad son los constituyentes químicos de las células, especialmente el tipo de grupos que se ligan a metales presentes en la membrana celular, y también a la presencia de ligandos orgánicos a los que se unen los metales. Gran parte de la información relativa a la interacción de metales pesados representa casos de sinergismo o antagonismo.

El papel del cobre, zinc y hierro como micronutrientes esenciales está bien documentado en la literatura como componentes metabólicos de las metaloenzimas mientras que se desconoce cualquier función fisiológica del cadmio. El zinc es un elemento esencial para la actividad del enzima anhidrasa carbónica, el cual incrementa la disponibilidad del CO_2 para la ribulosa bifosfato carboxilasa y la HCO_3^- fosfoenolpiruvato carboxilasa. El hierro forma parte de la estructura de muchos enzimas (catalasa, peroxidasa, etc.) y transportadores electrónicos (citocromos, etc). El cadmio tiene un efecto citotóxico en numerosos organismos

a través de la inhibición de numerosas actividades enzimáticas en el sistema mitocondrial, con alteraciones estructurales específicas.

Elevadas concentraciones de zinc en los sistemas acuáticos pueden ser peligrosos para los diferentes organismos vivos. Anualmente se vierten grandes cantidades de zinc en las aguas costeras marinas de regiones densamente pobladas (Young *et al.* 1980). La toxicidad y acumulación de zinc en especies cultivadas de microalgas han sido ampliamente estudiadas (Jensen *et al.*, 1974; Braek *et al.*, 1980). Sin embargo, algunos trabajos hablan de la necesidad de investigar los procesos físicos y biológicos implicados en la fijación del zinc por las microalgas, así como la adsorción, transporte transmembrana y metabolismo.

Aunque los niveles de cadmio en el mar en condiciones normales son aparentemente no tóxicos, este metal está reconocido como un contaminante ambiental peligroso (Hiatt and Huff, 1975) y su incorporación por el fitoplancton en el primer nivel de la cadena trófica marina puede ser de importancia ecológica. El fitoplancton juega un papel fundamental en la distribución geoquímica del cadmio, y éste puede ser transportado a niveles superiores de la cadena trófica.

Los resultados obtenidos en las experiencias realizadas con zinc y cobre muestran que la introducción de zinc, a la concentración utilizada, alivia la inhibición sobre el crecimiento de *P. tricornutum* (Tabla XI; Fig. 39 a 45). Estos resultados coinciden con los de Morel *et al.* (1978) y Rueter & Morel (1981), que muestran que la toxicidad del cobre sobre las diatomeas puede ser modificada por la presencia de silicio y zinc, encontrando antagonismo entre cobre y zinc. Numerosos autores han descrito interacciones de tipo sinérgico o antagónico entre zinc y cobre y entre zinc y cadmio (Braek *et al.*, 1976, 1980; Say & Whitton, 1977). Concretamente, Braek *et al.* (1976) encuentran que el zinc es capaz de aliviar la inhibición producida por cobre sobre el crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum*, y también se ha citado una interacción de tipo antagónico entre cobre y zinc sobre el volumen celular de *Phaeodactylum* y *Euglena* (Stratton & Corke, 1979), lo que coincide con los resultados obtenidos en nuestro estudio. Respecto al modo de interacción de estos dos metales, existen evidencias de que el zinc y el cobre compiten por el mismo sitio activo (Price & Quigley, 1966).

En contraste al fenómeno competitivo, la entrada de un metal a un organismo puede ser facilitada por la presencia de otro. La explicación más aceptada para el fenómeno de sinergismo es que la permeabilidad de membrana se incrementa (Campbell & Lewis, 1988).

En los resultados obtenidos en las experiencias de interacción entre cobre y hierro, y entre cobre y cadmio, los resultados muestran que cuando estos metales se introducen juntos en el medio de cultivo en las concentraciones ensayadas, la inhibición del crecimiento en *P. tricornutum* aumenta, dando lugar a una menor densidad celular a lo largo del periodo experimental en comparación con los datos obtenidos cuando el único metal introducido en el medio de cultivo es el cobre, produciéndose pues, una interacción de tipo sinérgico entre cobre y hierro, y entre cobre y cadmio (Tabla XI; Fig. 39 a 45). Estos resultados coinciden con los de otros autores que han descrito interacciones competitivas entre el cobre con potasio, cadmio, manganeso y níquel, y entre el cadmio y el cobre, hierro y zinc (Sunda *et al.*, 1981; Harrison y Morel, 1983; Babich *et al.*, 1984).

Conclusiones

1.- La toxicidad del cobre sobre el crecimiento de la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum* es función de las densidades celulares iniciales utilizadas en los ensayos. En el rango de concentraciones utilizadas, existe una relación lineal entre el tamaño del inóculo y la EC_{50} obtenida a las 48 horas de exposición al metal. A las 96 horas esta linearidad se mantiene sólo para densidades celulares iguales o menores 24×10^4 células ml^{-1} iniciales.

2.- La incorporación de 3H -timidina es una técnica rápida y sensible para la detección del efecto tóxico del cobre en *Phaeodactylum tricornutum*, mostrando una alta correlación con la tasa de crecimiento.

3.- El cobre afecta al metabolismo fotosintético de *Phaeodactylum tricornutum*. Concentraciones subletales de cobre inhiben la incorporación de ^{14}C -bicarbonato, disminuyen el contenido intracelular de ATP, alteran el patrón de pigmentos fotosintéticos y provocan un aumento de la fluorescencia de la clorofila *a*; esto indica que el transporte electrónico fotosintético es afectado por estas concentraciones de cobre.

4.- Concentraciones elevadas de cobre producen un aumento del volumen celular, la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, un incremento del pH intracelular, un incremento de la actividad peroxidasa celular y alteraciones en el potencial de membrana, tanto citoplasmática como mitocondrial, en las células de *Phaeodactylum tricornutum*.

5.- La citometría de flujo es una técnica válida para los estudios de toxicidad de metales pesados sobre microalgas, que permite obtener datos acerca del efecto de los metales tanto a nivel estructural como fisiológico.

6.- *Phaeodactylum tricornutum* es capaz de bioadsorber y bioacumular una fracción del cobre que se encuentra en el medio. La mayor parte del cobre retirado por estas células se encuentra adsorbido a su superficie celular.

7.- El efecto inhibitorio del cobre sobre el crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* es afectado por la presencia de otros iones metálicos en el medio. El zinc presenta un efecto antagónico, disminuyendo la toxicidad del cobre, mientras que el cadmio y el hierro tienen efectos sinérgicos, potenciando la toxicidad del cobre.

Bibliografía

- Abel, P.D. (Ed.) "Water Pollution Biology". Ellis Horwood, Chichester, U.K.
- Abel, T.H. & Bärlocher, F. 1984. Effects of cadmium on aquatic hyphomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 245-251.
- Anderson, M.A. & Morel, F.M.M. 1978. Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. *Limnol. Oceanogr.*, 23: 283-295.
- Anderson, M.A. & Morel, F.M. 1982. The influence of aqueous iron chemistry on the uptake of iron by the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnol. Oceanogr.*, 27: 789-814.
- Atchison, G.J., Henry, M.G. & Sandheirinch, M.B. 1987. Effects of metals on fish behaviour: a review. *Environ. Biol. Fishes*, 18: 11-25.
- Babich, H., Collins, Y.E., García-Toledo, A. & Stotzky, G. 1984. Interactions between Ni and Cu in their effects on heterotrophic microorganisms. Abstract, Annu. Meet. Am. Soc. Microbiology.
- Babich, H. & Stotzky, G. 1977a. Reductions in the toxicity of cadmium to microorganisms by clay minerals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 696-705.
- Babich, H. & Stotzky, G. 1977b. Effect of cadmium on fungi and on interactions between fungi and bacteria in soil: influence of clay minerals and pH. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 1059-1066.
- Babich, H. & Stotzky, G. 1978. Effects of cadmium on the biota: influence of environmental factors. *Adv. Appl. Microbiol.*, 23: 55-117.
- Babich, H. & Stotzky, G. 1980. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metal and gaseous pollutants to microorganisms. *Critical Rev. Microbiol.*, 8: 99-145.
- Babich, H. & Stotzky, G. 1983. Synergism between nickel and copper in their toxicity to microbes: mediation by pH. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 7: 576-587.

- Badley, R.A., Martin, W.G. & Schneider, H. 1973. Dynamic behaviour of fluorescent probes in lipid bilayer model membranes. *Biochemistry*, 12: 268-272.
- Balfoort, H.W., Berman, T., Maestrini, S.Y., Wenzel, A. & Zohary, T. 1992. Flow cytometry: instrumentation and application in phytoplankton research. *Hydrobiologia*, 238: 89-97.
- Barlett, L., Rabe, R.W. & Funk, W.H. 1974. Effects of copper, zinc and cadmium on *Selenastrum capricornutum*. *Water Res.*, 8: 179-185.
- Baylock, B.G., Frank, F.D. & McCarthy, J.F. 1985. Comparative toxicity of copper and acridine to fish, *Daphnia*, and algae. *Environ. Toxicol. Chem.*, 4: 63-71.
- Beardall, J. & Morris, I. 1976. The concept of light intensity adaptation in marine phytoplankton: some experiments with *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Biol.*, 37: 377-387.
- Berland, B.R., Bonin, D.J., Guerin-Ancey, O.J., Kaprov, V.I. & Arlhac, D.P. 1977. Action des métaux lourds sur les caractéristiques de la croissance chez la diatomée *Skeletonema costatum*. *Mar. Biol.*, 42: 17-30.
- Berland, B. & Chretiennot, M.J. 1984. Influence of source heavy metals on the evolution of phytoplanktonic and bacterial communities. Proc. Int. Symposium, n° 331 on Marine Bacteriology, CNRS Marseille, 1982. Bianchi, A. (Ed.). pp: 185-190.
- Bjornland, T. & Liaaen-Jensen, S. 1989. Distribution patterns of carotenoids in relation to chromophyte phylogeny and systematics. En: "The chromatophyte algae: problems and perspectives", Green, J.C., Leadbeater, B.S.C., Diver, W.L. (eds.). Clarendon Press, Oxford, p: 37-60.
- Bolaños, L., García-González, M., Mateo, P. & Bonilla, I. 1992. Differential toxicological response to cadmium in *Anabaena* strain PCC 7119 grown with NO_3^- and NH_4^+ as nitrogen source. *J. Plant Physiol.*, 140: 345-349.
- Braek, G.S., Jenesen, A. & Mohus, A. 1976. Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. 3. Combined effect of copper and zinc ions in cultures of four common species. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 25: 37-55.

- Braek, G.S., Malnes, D. & Jenesen, A. 1980. Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. 4. Combined effect of zinc and cadmium on growth and uptake in some marine diatoms. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 42: 39-54.
- Bucana, C., Saiki, I. & Nayar, R. 1986. Uptake and accumulation of the vital dye hydroethidine in neoplastic cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 34: 1109-1112.
- Butler, W.L. 1977. Chlorophyll fluorescence as a probe for electron transfer and energy transfer. En: "Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol. 5". Trebst, A. & Avron, M. (Eds.). Springer Verlag, Berlin, Germany. pp: 149-167.
- Campbell, P.G.C. & Lewis, A.G. 1988. Panel on biologically available metals in sediments. NRCC/CNRC Publications, Ottawa (Canada). pp.85.
- Cantenford, G.S. 1980. Formation and regeneration of abnormal cells of the marine diatom *Dytilum brightwellii* (West) Grunow. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 69: 243-253.
- Carretero, F. 1985. La citometría de flujo en el control de calidad de la criopreservación. *Biol. Clínica Hematol.*, 7: 121-134.
- Carreto, J.I. & Catoggio, J.A. 1976. Variations in pigment contents fo the diatom *Phaeodactylum tricornutum* during growth. *Mar. Biol.*, 36: 105-112.
- Cedeno-Maldonado, A. & Swader, J.A. 1974. Studies on the mechanism of copper toxicity in *Chlorella*. *Weed Sci.*, 22: 443-449.
- Clay, W.F., Matsuda, K., Hoshaw, R.W. & Rhodes, P.R. 1975. Nucleic acid metabolism in *Chlamydomonas moewusii* undergoing daily cell doubling. *Ann. Bot.*, 39: 525-533.
- Coleman, R.D., Coleman, R.L. & Rice, E.L. 1971. Zn and Co bioconcentration and toxicity in selected algal species. *Bot. Gaz.*, 132: 102-107.
- Collins, J.M. & Foster, K.A. 1983. Differentiation of promyelocytic (HL-60) cells into mature granulocytes: mitochondrial-specific rhodamine-123 fluorescence. *J. Cell Biol.*, 96: 94-99.

- Cooper, R.M. 1981. Pathogen-induced changes in host ultrastructure. En: "Plant Disease Control". Staples, R.C. & Toenniessen, G.H. (Eds.). Wiley. New York, USA. pp: 105-142.
- Couture, P. Visser, S.A., Vancoillie, R. & Blaise, C. 1985. Algal bioassays: their significance in monitoring water quality with respect to nutrients and toxicants. *Schweiz. Z. Hydrol.*, 47: 127-158.
- Chiapelli, F., Vasil, A. & Hagerty, D.F. 1979. The protein concentration of crude cell and tissue extracts as estimated by the method of the dye-binding: comparison with the Lowry method. *Anal. Biochem.* 94: 160-165.
- Daniel, G.F. & Chamberlain, A.H. 1981. Copper immobilization in fooling diatoms. *Bot. Mar.*, 24: 229-243.
- Darzynkiewicz, Z. & Andreeff, M. 1981. Multiparameter flow cytometry. Part 1: Application in analysis of cell cycle. *Clin. Bull.*, 11: 47-58.
- Darzynkiewicz, Z., Staiano-Coico, L. & Melamed, M.R. 1981. Increased mitochondrial uptake of rhodamine 123 during lymphocyte stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2383-2391.
- Davies, A.G. 1974. The growth kinetics of *Isochrysis galbana* in cultures containing sublethal concentrations of mercuric chloride. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 54: 157-169.
- Davies, A.G. 1976. An assessment of the basis of mercury tolerance in *Dunaliella tertiolecta*. *J. mar. biol. Ass. UK*, 56: 39-57.
- Davies, I. & Sigee, D.C. 1984. Cell ageing and cell death: perspectives. En: "Cell Ageing and Cell Death". Davies, I. & Sigee, D.C. (Eds.). Cambridge Univ. Press. London, UK. pp: 347-350.
- Deme, S. 1971. Semiconductor detector for nuclear radiation measurement. Hilger (London).
- Dhindsa, R.J., Dhindsa, P.P. & Thorpe, T.A. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.*, 32: 93-101.

- Dive, C., Workman, P. & Watson, J.V. 1987. Improved methodology for intracellular enzyme reaction and inhibition kinetics by flow cytometry. *Cytometry*, 8: 552-561.
- Eichenberger, E. 1986. The interrelation between essentiality and toxicity of metals in the aquatic ecosystems. En "Metal ions in biological systems. vol. 20. Concepts on metal ion toxicity". Sigel, H. (Ed.). Marcel Dekker, Inc. New York, USA pp: 67-100.
- Erickson, S.J. 1972. Toxicity of copper to *Thalassiosira pseudonana* in unenriched inshore seawater. *J. Phycol.*, 8: 318-323.
- Evenson, D.P., Darzynkiewicz, Z. & Melamed, M.R. 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of spem viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J. Histochem. Cytochem.*, 30: 279-290.
- Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. & Veiga, M. 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutreint concentrations. *Aquaculture* 42: 207-245.
- Felle, H. 1989. pH as a second messenger in plants. En: "Second Messengers in Plant Growth and Development". Boss, W.F. & Morré, D.J. (Eds.). Alan Liss, Inc. New York, USA. pp: 145-166.
- Fergusson, J.E. 1990. "The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects". Pergamon Press. Oxford, UK. 614 pp.
- Fisher, N.S. & Jones, G.J. 1981. Effects of copper and zinc on growth, morphology and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve). *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 51: 37-56.
- Fisher, N.S., Jones, G.J. & Nelson, D.M. 1981. Effects of copper and zinc on growth, morphology and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve). *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 51: 37-56.
- Florence, T.M., Lumsden, B.G. & Fardy, J.J. 1983. Evaluation of some physico-chemical techniques for the determination of the fraction of dissolved copper toxic to the marine diatom, *Nitzschia closterium*. *Anal. chim. Acta*, 151: 281-295.

- Florence, T.M. & Stauber, J.L. 1986. Toxicity of copper complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Aquat. Toxicol.*, 8: 11-26.
- Foster, P.L. & Morel, F.M.M. 1982. Reversal of cadmium toxicity in a diatom: An interaction between cadmium activity and iron. *Limnol. Oceanogr.*, 27:745-752.
- Frankfurt, O.S. 1990. Flow cytometric measurement of cell viability using DNase exclusion. En: "Methods in Cell Biology. vol. 33. Flow Cytometry". Darzynkiewicz, Z. & Crissman, H.A. (Eds.). Academic Press. San Diego, California, USA. pp: 13-18.
- Frelin, C., Vigne, P., Ladoux, A. & Lazdunski, M. 1988. The regulation of the intracellular pH in cells from vertebrates. *Eur. J. Biochem.*, 174: 3-14.
- Fujisawa, H. & Amemiya, S. 1982. Effects of zinc and lithium ions on the strengthening cell adhesion in sea urchin blastulae. *Experientia*, 38: 852-
- Furness, R.W. & Rainbow, P.S. (Eds.) 1990. "Heavy metals in the marine environment". CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, USA. 256 pp.
- Gächter, R. 1976. Untersuchungen über die Beeinflussung der planktischen Photosynthese durch anorganische Metallsalze in eutrophen Alpenachseer und der mesotrophen Horwer Bucht. *Schweiz. Z. Hydrobiol.*, 35: 252-261.
- Gadd, G.M. & Griffiths, A.J. 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecol.*, 4: 303-317.
- Gahan, P.B. 1984. Reversible and irreversible damage in plant cells of different ages. En: "Cell Ageing and Cell Death". Davies, I. & Sigeo, D.C. (Eds.). Cambridge Univ. Press. London, UK. pp: 155-169.
- Gallagher, J. C., Wood, A.M. & Alberte, R.S. 1984. Ecotypic differentiation in the marine diatom *Skeletonema costatum* influence of light intensity on the photosynthetic apparatus. *Mar. Biol.*, 82: 121-134.
- Garnham, G.W., Codd, G.A. & Gadd, G.M. 1992. Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella salina*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 270-276.

- Gavis, J. 1983. Toxic binding of cupric ion by marine phytoplankton. *J. mar. Res.*, 41: 53-63.
- Gnassia-Barelli, M. & Roméo, M. 1987. Uptake of zinc by cultured phytoplankters *Hymenomonas elongata*. *Dis. aquat. Org.*, 3: 45-49.
- Goldstein, I.M. & Weissmann, G. 1977. Effects of generation of superoxide anion on permeability of liposomes. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 70: 452-458.
- Grogan, W.M. & Collins, J.M. 1990. Guide to flow cytometry methods. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 228 pp.
- Gupta, A.B. & Arora, A. 1978. Morphology and physiology of *Lyngbya nigra* with reference to copper toxicity. *Physiol. Plant.*, 44: 215-220.
- Hallegraeff, G.M. & Jeffrey, S.W. 1985. Description of new chlorophyll a alteration products in marine phytoplankton. *Deep-Sea Res.*, 32: 697-705.
- Harris, E.H. 1988. "The *Chlamydomonas* sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use". Academic Press, Inc. San Diego, California. 780 PP.
- Harrison, G.I. & Morel, F.M.M. 1983. Antagonism between Cd and Fe in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *J. Phycol.*, 19: 498-507.
- Hasmann, M., Valet, G.K., Tapiero, H., Trevorrow, K. & Lampidis, T. 1989. Membrane potential differences between adriamycin-sensitive and -resistant cells as measured by flow cytometry. *Biochem. Pharmacol.*, 38: 305-312.
- Haugland, R.P. 1992. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. 5th Edition. Laison, K.D. (Ed.). Molecular Probes, Inc., Oregon, USA. 421 pp.
- Hiatt, V. & Huff, J.E. 1975. The environmental impact of cadmium. An overview. *Int. J. Environ. Stud.*, 7: 277-285.
- Hollibaugh, J.T., Seibert, D.L.R. & Thomas, W.H. 1980. A comparison of the acute toxicities of ions of 10 heavy metals to phytoplankton from Saanich Inlet, B.C. Canada Est. Coast. Water Res., 10: 93-105.

- Holm-Hansen, O., Lorenzen, C.J., Holmes, R.W. & Strickland, J.D.H. 1965. Fluorimetric determination of chlorophyll. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer* 30: 3-15.
- Hooks, C.E., Bidigare, R.R., Keller, M.D. & Guillard, R.R.L. 1988. Coccoid eukaryotic marine ultraplankters with four different HPLC pigment signatures. *J. Phycol.* 24: 571-580.
- Hörnström, E. 1990. Toxicity test with algae. A discussion on the batch method. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 20: 343-353.
- Hughes, M.N. & Poole, R.K. 1989 "Metals and micro-organisms" Chapman and Hall Ltd. London, UK. 412 pp.
- Humphrey, G.F. 1979. Photosynthetic characteristics of algae grown under constant illumination and light-dark regimes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 40: 63-70.
- Humphrey, G.F. 1983. The effect of the spectral composition of the light on the growth, pigments, and photosynthetic rate of unicellular marine algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 66: 49-67.
- Huntsman, S.A. & Sunda, W.G. 1980. The role of trace metals in regulating phytoplankton growth with emphasis on Fe, Mn and Cu, Part 8. En: "The Physiological Ecology of Phytoplankton". Morris, I. (Ed.) Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.
- Ilangoban, K., Salazar, M., Dash, S., Monroy, O.H. & Ramos, C.A. 1992. Interaction of cadmium, copper and zinc in *Chlorella pyrenoidosa*. *Chick. Environ. Technol.*, 13: 195-199.
- Irato, P. & Piccini, E. 1987. Effetti del cadmio in *Tetrahymena pyriformis*. *Boll. Soc. Ital. Ecol.* 207.
- Jackson, G.A. & Morgan, J.J. 1978. Trace metal-chelator interactions and phytoplankton growth in seawater media: Theoretical analysis and comparison with reported observations. *Limnol. Oceanogr.*, 23: 268-282.
- Jeffrey, S.W. 1974. Profiles of photosynthetic pigments in ocean using thin-layer chromatography. *Mar. Biol.* 26: 101-110.

- Jeffrey, S.W. 1980. Algal pigment systems. En: "Primary productivity in the sea" Falkowski, P.G. (Ed.). Plenum Press. New York, USA. pp: 33-58.
- Jeffrey, S.W. 1981. An improved thin-layer chromatographic technique for marine phytoplankton pigments. *Limnol. Oceanogr.* 26: 191-197.
- Jeffrey, S.W. & Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c_1 and c_2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 167: 191-194.
- Jeffrey, S.W. & Stauber, J.L. 1985. Photosynthetic pigments in diatoms. Abstracts of the Second International Phycological Congress, Copenhagen, Denmark. pp: 74.
- Jennings, J.R. & Rainbow, P.S. 1979. Accumulation of cadmium by *Dunaliella tertiolecta* Butcher. *J. Plankton Res.*, 1: 67-74.
- Jensen, A., Rystad, B. & Melsom, S. 1974. Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. I. The tolerance of three algal species to zinc in coastal seawater. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 15: 145-157.
- Jensen, A., Rystad, B. & Melsom, S. 1976. Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. II. Copper tolerance of three species in dialysis and batch cultures. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 22: 249-256.
- Jorgensen, E.G. 1977. Photosynthesis. En: "The Biology of Diatoms". Botanical Monographs. Vol. 13. Dietrich Werner Ed.
- Kanawaza, T. & Kanawaza, K. 1969. Specific inhibitory effect of copper on cellular division in *Chlorella*. *Plant Cell Physiol.*, 10: 495-502.
- Karl, D.M. 1982. Selected nucleic acid precursors in studies of aquatic microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44: 891-902.
- Karl, D.M. 1986. Determination of *in situ* microbial biomass, viability, metabolism, and growth. En: "Bacteria in Nature. Vol. 2. Methods and special applications in bacterial ecology". Poindexter, J.S. & Leadbetter, E.R. (Eds.). Plenum Press. New York, USA. pp: 85-176.

- Kellogg, E.W. & Fridovich, I. 1975. Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by the xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.*, 250: 8812-8817.
- Kenninsh, M.J. "Ecology of estuaries: anthropogenic effects. CRC Press Inc. Boca Ratón Florida, USA. 494 pp.
- Khan, S.H. & Saifullah, S.M. 1986. Bioassay studies of phytoplankton of coastal waters of Kavachi, Pakistan, in relation to heavy metals pollution. I. Effect of copper and lead on *Skeletonema costatum*. *Pak. J. Bot.*, 18: 137-146.
- Klein, B. 1988. Variations of pigment content in two benthic diatoms during growth in batch cultures. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 115: 237-248.
- Köhler, K., Steigner, W., Kolbowski, J., Hansen, U.P., Simonis, W. & Urbach, W. 1986. Potassium channels in *Eremosphaera viridis*. II. Current voltage-clamp experiments. *Planta*, 167: 66-75.
- Kojima, Y. 1988. Metallothionein. En: "Bioactive Molecules. Vol. 8. Metalloproteins. Chemical Properties and Biological Effects". Otsuka, S. & Yamanaka, T. (Eds.). Elsevier. pp: 539-550.
- Kulshrestha, S.K., Adholea, U.N., Khan, A.A., Bhatnagar, A., Saxena, M. & Baghail, M. 1989. Community structure of plankton and macrozoobenthos, with special reference to pollution in the River Khan (India). *Int. J. Environ. Stud.* 35:83-96.
- Kurkdjian, A. & Guern, J. 1989. Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40: 271-303.
- Kuyucak, N. & Volesky, B. 1990. Biosorption by algal biomass. En: "Biosorption of Heavy Metals". Volesky, B. (Ed.). CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida. pp: 173-198.
- Larsson, C.-M. & Olsson, T. 1979. Firefly assay of adenine nucleotides from algae: Comparison of extraction methods. *Plant Cell Physiol.*, 20: 145-155.
- Lee, C. & Chen, L.B. 1988. Dynamic behavior of endoplasmic reticulum in living cells. *Cell*, 54: 37-41.

- Legendre, L. & Yentsch, C.M. 1989. Overview of flow cytometry and image analysis in biological oceanography and limnology. *Cytometry*, 10: 501-510.
- Leland, H.V. & Kuwabara, J.J. 1984. Trace metals. En: "Fundamentals of aquatic toxicology" Rand, G.M. & Petrocelli, S.R. (Eds.). Hemisphere Publishing, Washington, USA. pp: 134
- Lewin, J.C. 1954. Silicon metabolism in diatoms. 1. Evidence for the role of reduced sulfur compounds in silicon utilization. *J. Genet. Physiol.*, 37: 538-599.
- Lorenzen, C.J. 1967. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* 12: 343-346.
- Lorenzen, C.J. & Jeffrey, S.W. 1980. Determinations of chlorophyll in seawater. UNESCO Tech. Pap. Mar. Sci. 35, p. 1-20.
- Lubián, L.M., Establier, R. & Ruiz, E. 1986. La luz y el nitrato en el crecimiento y contenido de pigmentos en cultivos de *Nannochloropsis gaditana* Lubián. *Invest. Pesq.*, 50: 499-517.
- Lynch, R.M., Fogarty, K.E. & Fay, F.S. 1991. Modulation of hexokinase association with mitochondria analyzed with quantitative three-dimensional confocal microscopy. *J. Cell Biol.*, 112: 385-396.
- Macaskie, L.E. 1991. The application of biotechnology of the treatment of wastes from the nuclear fuel cycle: biodegradation and bioaccumulation as a means of treating radionuclide containing streams. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 11:41-112.
- MacInnes, J. & Thurberg, F. 1973. Effects of metals on the behaviour and oxygen consumption of the mud snail. *Mar. Pollut. Bull.*, 4: 185-191.
- McConnell, S.J. et al. 1990. Temperature-sensitive yeast mutants defective in mitochondrial inheritance. *J. Cell Biol.*, 111: 967-
- McRae, D.G. & Thompson, J.E. 1985. Senescence-related changes in photosynthetic electron transport are not due to alterations in thylakoid fluidity. *Biochim. Biophys. Acta*, 810: 200-208.

- Manatran, S.E. & Smith, M.J. 1973. Copper micronutrient requirement for algae. *Environ. Sci. Tech.*, 7: 829-833.
- Mandeli, E.F. 1969. The inhibitory effect of copper on marine phytoplankton. *Contrib. Mar. Sci.*, 14: 47-57.
- Mantoura, R.F.C. & Llewellyn, C.A. 1983. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural water reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 151: 297-314.
- Marti, G.E., Magruder, L., Schuette, W.E. & Gralnick, H.R. 1988. Flow cytometry analysis of platelet surface antigens. *Cytometry*, 9: 448-455.
- Merian, E. (Ed.) 1991. "Metals and their compounds in the environment. Occurrence, analysis, and biological relevance". VCH. Weinheim, Germany. 1438 pp.
- Messer, G. & Ben-Shaul, Y. 1972. Changes in chloroplast structure during culture growth of *Peridinium cinctum* Fa. *westii* (Dinophyceae). *Phycologia*, 11: 291-299.
- Metaxas, A. & Lewis, A.G. 1991. Copper tolerance of *Skeletonema costatum* and *Nitzschia thermalis*. *Aquat. Toxicol.*, 19: 265-280.
- Moody, W. 1984. Effects of intracellular H⁺ on the electrical properties of excitable cells. *Annu. Rev. Neurosci.*, 7: 257-278.
- Moody, R.P., Weinberger, P. & Greenhalgh, R. 1983. Algal fluorometric determination of the potential phytotoxicity of environmental pollutants. En: "Aquatic Toxicology. Vol. 13". Nriagu, O. (Ed.). Wiley-Interscience. New York, USA. pp: 504-512.
- Morel, F. & Morgan, J.J. 1972. A numerical method for computing equilibria in aqueous chemical systems. *Environ. Sci. Technol.*, 6: 58-62.
- Morel, N.M.L., Rueter, J.G. & Morel, F.M.M. 1978. Copper toxicity to *Skeletonema costatum*. *J. Phycol.*, 14: 43-48.

- Morgan, J.J. & Stumm, W. 1991. Chemical processes in the environment, relevance of chemical speciation. En: "Metals and their compounds in the environment. Occurrence, analysis, and biological relevance". Merian, E. (Ed.). VCH. Weinheim, Germany. pp: 67-103.
- Moriarty, D.J.W., 1984. Measurements of bacterial growth rates in some marine systems using the incorporation of tritiated thymidine into DNA. En: "Heterotrophic activity in the sea". Hobbie, J.E. & Williams, P.J. (Eds.) Plenum Press, New York. pp: 217-231.
- Murthy, S.D.S., Bukhov, N.G. & Mohanty, P. 1990. Mercury-induced alterations of chlorophyll *a* fluorescence kinetics in cyanobacteria: multiple effects of mercury on electron transport. *J. Photochem. Photobiol., B: Biology*, 6: 373-380.
- Nakajima, A. Horikoshi, T. & Sakaguchi, T. 1981. Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. XVII. Selective accumulation of heavy metal ions by *Chlorella regularis*. *Eur J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 12: 76-83.
- Neame, K.D. & Homewood, C.A. 1974. "Introduction to liquid scintillation counting". Butterworth and Co. (Publishers) Ltd. London. pp: 28-62.
- Neyfakh, A.A. 1987. Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance. *Exp. Cell Res.*, 174: 168-180.
- Nieboer, E. & Richardson, D.H.S. 1980. The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut. (ser. B)*, 1: 3-26.
- Niehaus, W.G. 1978. A proposed role of superoxide anion as a biological nucleophile in the deesterification of phospholipids. *Bioorg. Chem.*, 7: 77-84.
- Noodén, L.D. 1988. The phenomena of senescence and aging. En: "Senescence and aging in plants". Noodén, L.D. & Leopold, A.C. (Eds.). Academic Press, Inc. San Diego, California, USA. pp: 1-50.
- Nuzzi, R. 1972. Toxicity of mercury to phytoplankton. *Nature*, 237: 38-39.

- Ober, S.S. & Pardee, A.B. 1987. Intracellular pH is increased after transformation of Chinese hamster embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 2766-2770.
- Odum, E.P. 1971. *Fundamentals of ecology*. 3rd edition. Saunders College Publishing, Philadelphia. 574 pp.
- O'Kelley, J.C. 1974. Inorganic nutrients. En: "Algal Physiology and Biochemistry" Stewart, W.D.P. (Ed.). Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. pp: 610-635.
- Ormerod, M.G. 1990. Analysis of DNA. General methods. En: "Flow Cytometry. A Practical Approach." Ormerod, M.G. (Ed.). Oxford University Press, Oxford, U.K. pp: 69-87.
- Overnell, J. 1975. The effect of heavy metals on photosynthesis and loss of cell potassium in two species of marine alga *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Biol.*, 29: 99-103.
- Pagenkopf, G.K., Russo, R.C. & Thurston, R.V. 1979. Effect of complexation on toxicity of copper to fish. *Fish. Res. Bd. Can.*, 31: 462-465.
- Papa, S., Capitani, S., Matteucci, A., Vitale, M., Santi, P., Martelli, A.M., Maraldi, N.M. & Manzoli, F.A. 1987. Flow cytometric analysis of isolated rat liver nuclei during growth. *Cytometry*, 8: 595-601.
- Passow, H., Rothstein, A. & Clarkson, T.W. 1961. The general pharmacology of the heavy metals. *Pharmacol. Rev.*, 13: 185-224.
- Pegg, G.F. 1981. The role of nonspecific toxins and hormone changes in disease severity. En: "Plant Disease Control". Staples, R.C. & Toenniessen, G.H. (Eds.). Wiley. New York, USA. pp: 13-31.
- Penning de Vries, F.W.T. 1975. The cost of maintenance processes in plant cells. *Ann. Bot.*, 39: 77-92.
- Peterson, S.L., Bennett, L.G. & Tornabene, T.G. 1975. Effects of lead on the lipid composition of *Micrococcus* cells. *Appl. Microbiol.*, 29: 669-679.

- Phillips, G.R. & Buhler, D.R. 1978. The relative contribution of methyl-mercury from food or water to rainbow trout in a controlled laboratory experiment. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 107: 853-861.
- Phinney, D.A. & Cucci, T.L. 1989. Flow cytometry and phytoplankton. *Cytometry*, 10: 511-521.
- Pisanti, F.A., Lucadamo, L., Varzanell, F. & Aloj Totaro, E. 1988. Effect of heavy metal ions on microorganism aging. *Mar. Poll. Bull.*, 10: 328-333.
- Pouyssegur, J., Franchi, A. & L'allemain, G. 1985. Cytoplasmic pH a key determinant of growth factor-induced DNA synthesis in quiescent fibroblasts. *FEBS Lett.*, 190: 115-119.
- Price, C.A. & Quigley, J.W. 1966. A method for determining quantitative zinc requirements for growth. *Soil Sci.*, 101: 11-16.
- Prevot, P. & Soyer, M.O. 1979. Etude des mecanismes toxicologiques des metaux lourds au niveau cellulaire. 1. Action du cadmium sur un dinoflagelle marin: *Prorocentrum micans*. Lab. Arago. Banyuls-sur-Mer (France) pp: 7-10.
- Rabinovitch, P.S. & June, C.H. 1990. Intracellular ionized calcium, membrane potential, and pH. En: "Flow Cytometry. A Practical Approach." Ormerod, M.G. (Ed.). Oxford University Press, Oxford, U.K. pp: 161-186.
- Rachlin, J.W., Jensen, T.E., Baxter, M. & Jani, V. 1982a. The growth response of a green alga (*Chlorella saccharophila*) to selected concentrations of the heavy metals Cd, Cu, Pb and Zn. Proceedings of the XVI Symposium on trace substances in environmental health. Hemphill, D.D. (Ed.) University of Missouri, Columbia, USA. pp: 145-154.
- Rachlin, J.W., Jensen, T.E. & Warkentine, B. 1982b. Utilization of morphometric analysis in evaluating response of *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) to exposure to eight heavy metals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 11: 323-333.
- Rachlin, J.W., Jensen, T.E. & Warkentine, B. 1983a. The growth response of the diatom *Navicula incerta* to selected concentrations of the metals: cadmium, copper, lead and zinc. *Bull. Torrey Bot. Club*, 110: 217-223.

- Rachlin, J.W., Warkentine, B. & Jensen, T.E. 1983b. The response of the marine diatom *Nitzschia closterium* to selected concentrations of divalent cations Cd, Cu, Pb and Zn. Proceedings of the XVII Symposium on trace substances in environmental health. Hemphill, D.D. (Ed.) University of Missouri, Columbia, USA. pp: 72-81.
- Rai, L.C., Gaur, J.P. & Kumar, H.D. 1981. Phycology and heavy metal pollution. *Biol. Rev.*, 56: 99-151.
- Rai, L.C., Singh, A.K. & Mallick, N. 1991. Studies on photosynthesis, the associated electron transport system and some physiological variables of *Chlorella vulgaris* under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.*, 137: 419-424.
- Rainbow, P.S. 1985. The biology of heavy metals in the sea. *Int. J. Environ. Stand.*, 25: 195-
- Reader, S., Marion, M. & Denizeau, F. 1993. Flow cytometric analysis of the effects of tri-*n*-butyltin chloride on cytosolic free calcium and thiol levels in isolated rainbow trout hepatocytes. *Toxicology*, 80: 117-129.
- Redpath, K.J. 1985. Growth inhibition and recovery in mussels (*Mytilus edulis*) exposed to low copper concentrations. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 65: 421-
- Reed, R.H. & Gadd, G.M. 1990. Metal tolerance in eukaryotic and prokaryotic algae. En: "Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects". Shaw, J. (ed.) CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, USA, pp: 105-118.
- Reinheimer, G. 1991. Aquatic Microbiology. 4th edition. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK. 363 pp.
- Remacle, J. 1990. The cell wall and metal binding. En: "Biosorption of Heavy Metals". Volesky, B. (Ed.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp: 83-92.
- Reynolds, C.S. 1984. The Ecology of Freshwater Phytoplankton. Cambridge Univ. Press. Cambridge, UK.
- Riisgard, H.V., Nielsen, K.N. & Sogaard-Jensen, B. 1980. Further studies on volume regulation and effects of copper in relation to pH and EDTA in the naked marine flagellater *Dunaliella marina*. *Mar. Biol.*, 56: 267-276.

- Roomans, G.M., Theuvent, A.P.R., Van den Berg, T.P.R. & Borst-Pauwels, G.W.F.H. 1979. Kinetics of Ca^{2+} and Sr^{2+} uptake by yeast. Effect of pH, cations and phosphate. *Biochim. Biophys. Acta*, 551: 187-196.
- Rosko, J.J. & Rachlin, J.W. 1977. The effect of cadmium, copper, mercury, zinc and lead on cell division, growth and chlorophyll a content on the chlorophyta *Chlorella vulgaris*. *Bull. Torrey Bot. Club*, 104: 226-233.
- Rothe, G., Oser, A. & Valet, G. 1988. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften*, 75: 354-360.
- Rothe, G. & Valet, G. 1990. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescin. *J. Leukocyte Biol.*, 47: 440-449.
- Roy, S. 1987. High performance liquid chromatographic analysis of chloropigments. *J. Chromatogr.* 391: 19-34.
- Roy, S. 1988. Effects of changes in physiological condition on HPLC-defined chloropigment composition of *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin) in batch and turbidostat cultures. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 118: 137-149.
- Rueter, J.G., Chisholm, S.W. & Morel, F.M.M. 1981. The effect of copper toxicity on silicic acid uptake and growth in *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 17: 270-278.
- Rueter, J.G. & McCarthy, J.J. 1979. The toxic effect of copper on *Oscillatoria* (Trichodesmium) *theibauti*. *Limnol. Oceanogr.* 24: 558-562.
- Rueter, J.G. & Morel, F.M.M. 1981. The interaction between zinc deficiency and copper toxicity as it affects the silicic acid uptake mechanisms in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Limnol. Oceanogr.*, 26: 67-73.
- Saifullah, S.M. 1978. Inhibitory effects of copper on marine dinoflagellates. *Mar. Biol.*, 44: 299-308.

- Saila, S.B., Recksiek, C.W. & Prager, M.H. 1988. Developments in aquaculture and fisheries science. Vol. 18. Basic fishery science programs. A compendium of microcomputer programs and manual of operation. Elsevier. Amsterdam, Holland. 346 pp.
- Samson, G., Morissette, J.C. & Popovic, R. 1988. Copper quenching of the variable fluorescence in *Dunaliella tertiolecta*. New evidence for a copper inhibition effect on PS II photochemistry. *Photochem. Photobiol.*, 48: 329-332.
- Samson, G. & Popovic, R. 1988. Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 16: 272-278.
- Sandmann, G. & Boger, P. 1980. Copper deficiency and toxicity in *Scenedesmus*. *J. Pflanzenphysiol.*, 98: 53-59.
- Sandmann, G. & Boger, P. 1980b. Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. *Pl. Physiol.*, 66: 797-800.
- Sarkar, B. 1988. Copper. En: "Handbook on toxicity of inorganic compounds". Seiler, H.G., Sigel, H. & Sigel, A. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- Sathya, K.S. & Balakrishnam, K.P. 1988. Physiology of phytoplankton in relation to metal concentration. Effect of cadmium on *Scenedesmus bijugatus* and *Nitzschia palea*. *Water Air Soil Poll.*, 38: 283-297.
- Say, P.J. & Whitton, B.A. 1977. Influence of zinc on lotic plants. 2. Environmental effects on toxicity of zinc to *Hormidium uvulare*. *Freshwater Biol.*, 7: 379-384.
- Schanz, F. & Zahler, U. 1981. Prediction of algal growth in batch cultures. *Schweiz. Z. Hydrobiol.* 43: 103-113.
- Scheinberg, H.I. 1991. Copper. En: "Metals and their compounds in the environment. Occurrence, analysis, and biological relevance". Merian, E. (Ed.) VCH. Weinheim, Germany. pp: 893-908.

- Shapiro, H.M. 1990. Cell membrane potential analysis. En: "Methods in Cell Biology. vol.33. Flow Cytometry". Darzynkiewicz, Z. & Crissman, H.A. (Eds.). Academic Press. San Diego, California, USA. pp: 25-36.
- Shimura, S. & Fujita, Y. 1975. Changes in the activity of fucoxanthin-excited photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* grown under different conditions. Mar. Biol., 33: 185-194.
- Shinitzky, M. 1984. Membrane fluidity and cellular functions. En: "Physiology of Membranes Fluidity. Vol. 1". Shinitzky, M. (Ed.). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. pp: 1-52.
- Shioi, Y., Tamai, H. & Sasa, T. 1978. Effects of copper on photosynthetic electron transport in spinach chloroplast. Plant Cell Physiol., 19: 203-209.
- Sicko-Goad, L. 1982. A morphometric analysis of algal response to low dose, short-term heavy metal exposure. Protoplasma, 110: 75-86.
- Sicko-Goad, L. & Stoermer, E.F. 1979. A morphometric study of lead and copper effects in *Diatoma tenue* (Bacillariophyta). J. Phycol., 15: 316-331.
- Sigg, L. 1987. Surface chemical aspects of the distribution and fate of metal ions in lakes. En: "Aquatic surface chemistry, chemical processes at the particle-water interface". Stumm, W. (Ed.). Wiley-Interscience. New York, USA. pp 319-349
- Silverberg, B.A., Stokes, P.M. & Ferstenberg, L.B. 1976. Intranuclear complexes in a copper-tolerant green alga. J. Cell Biol., 69: 210-214.
- Singh, D.P. & Singh, S.P. 1987. Action of heavy metals on Hill activity and O₂ evolution in *Anacystis nidulans*. Plant. Physiol., 83: 12-14.
- Smith, M.A. 1983. The effect of heavy metals on the cytoplasmic fine structure of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta). Protoplasma, 116: 14-23.
- Sorentino, C. 1979. The effects of heavy metals on phytoplankton. A review. Phycos, 18: 149-161.

- Stauber, J.L. & Florence, T.M. 1985. Interactions of copper and manganese: a mechanism by which manganese alleviates copper toxicity to the marine diatom *Nitzschia closterium* (Ehrenberg) W. Smith. *Aquat. Toxicol.*, 7: 241-254.
- Stauber, J.L. & Florence, T.M. 1985b. The influence of iron on copper toxicity to the marine diatom, *Nitzschia closterium* (Ehrenberg) W. Smith. *Aquat. Toxicol.*, 6: 297-305
- Stauber, J.L. & Florence, T.M. 1987. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Mar. Biol.*, 94: 511-519.
- Stauber, J.L. & Florence, T.M. 1990. Mechanism of toxicity of zinc to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Mar. Biol.*, 105: 519-524.
- Stebbing, A.R.D. 1976. The effects of low metal levels on a clonal hydroid. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 56: 977-
- Stebbing, A.R.D. 1981. Hormesis-stimulation of colony growth in *Campanularia flexuosa* (Hydrozoa) by copper, cadmium and other toxicants. *Aquat. Toxicol.*, 1: 227-
- Steemann-Nielsen, E. & Kamp-Nielsen, L. 1970. Influence of deleterious concentrations of copper on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiol. Plant.*, 23: 828-840.
- Steemann-Nielsen, E. & Wiium-Andersen, S. 1970. Copper ions as poison in the sea and in fresh water. *Mar. Biol.* 6: 93-97.
- Steigner, W., Köhler, K., Simonis, W. & Urbach, W. 1988. Transient cytoplasmic pH changes in correlation with opening of potassium channels in *Eremosphaera*. *J. Exp. Bot.*, 39: 23-26.
- Sterritt, R.M. & Lester, J.N. 1980. *Sci. Total Environ.*, 14: 5-17.
- Stieglitz, L., Dickson, L.C. & Naikwachi, K.P. 1988. Carbonaceous particles in fly ash. En: "Proceedings of the 8th International Symposium of Chlorinated Dioxins and Related Compounds". Umea, Sweden.

- Stokes, P.M., Hutchinson, T.C. & Krauter, K. 1973. Heavy-metal tolerance in algae isolated from contaminated lakes near Sudbury, Ontario smelters. *Can. J. Bot.*, 51: 2155-2168.
- Stratton, G.W. & Corke, C.T. 1979. The effect of mercuric, cadmium and nickel ion combinations on a blue-green alga. *Chemosphere*, 10: 731-740.
- Strickland, J.D.H. & Parsons, T.R. 1972. A practical handbook of seawater analysis, 2nd edn. *Bull. Fish. Res. Bd Can.* 167.
- Strom, S.L. & Welschmeyer, N.A. 1991. Pigment-specific rates of phytoplankton growth and microzooplankton grazing in the open subarctic Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 36: 50-63.
- Sunda, W.G. 1988. Trace metal interactions with marine phytoplankton. *Biol. Oceanogr.* 6: 411-442.
- Sunda, W.G., Barber, R.T. & Huntsman, S.A. 1981. Phytoplankton growth in nutrient-rich seawater; importance of Cu-Mn cellular interactions. *J. mar. Res.*, 39: 567-586.
- Sunda, W.G. & Gillespie, P.A. 1979. The response of a marine bacterium to cupric ion and its use to estimate cupric ion activity. *J. mar. Res.*, 37: 761-777.
- Sunda, W.G. & Guillard, R.R.L. 1976. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *J. mar. Res.*, 34: 511-529.
- Sunda, W.G. & Huntsman, S.A. 1983. Effect of competitive interactions between manganese and copper on cellular manganese and growth in estuarine and oceanic species of the diatom *Thalassiosira*. *Limnol. Oceanogr.*, 28: 924-934.
- Tarchevskii, I.A., Lozavaya, V.V., Gordon, L. & Akhmerova, A.A. 1982. Changes in the synthesis of structural polysaccharides under modification of the plasmalemma with lead nitrate and pipolphen. *Fiziol. Rast.*, 29: 895-900.
- Terasaki, M. 1990. Recent progress on structural interactions of the endoplasmic reticulum. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 15: 71-73.

- Terasaki, M., Chen, L.B. & Fujiwara, K. 1986. Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J. Cell Biol.*, 103: 1557-1560.
- Thomas, W.H., Hollibaugh, J.T. & Seibert, D.L.R. 1980. Effects of heavy metals on the morphology of some marine phytoplankton. *Phycologia*, 19: 202-209.
- Thomas, W.H., Seibert, D.L.R. & Takahashi, M. 1977. Controlled ecosystem pollution experiment. Effect of mercury on enclosed water columns. III. Phytoplankton population dynamics and production. *Mar. Sci. Comm.*, 3: 331-354.
- Thompson, J.E. 1974. The behaviour of cytoplasmic membranes in *Phaseolus vulgaris* cotyledons during germination. *Can. J. Bot.*, 52: 534-541.
- Thompson, J.E. 1988. The molecular basis for membrane deterioration during senescence. En: "Senescence and aging in plants". Noodén, L.D. & Leopold, A.C. (Eds.). Academic Press, Inc. San Diego, California, USA. pp: 51-83.
- Thurberg, F.P., Dawson, M.A. & Collier, R.S. 1973. Effects of copper and cadmium on osmoregulation and oxygen consumption in two species of stuarine crabs. *Mar. Biol.*, 23: 171-
- Toppari, J., Bishop, P.C., Parker, J.W. & diZerega, G.S. 1988. DNA flow cytometric analysis of mouse seminiferous epithelium. *Cytometry*, 9: 456-462.
- Tubbing, D.M.J. & Admiraal, W. 1991a. Inhibition of bacterial and phytoplanktonic metabolic activity in the lower River Rhine by ditallowdimethylammonium chloride. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 3616-3622.
- Tubbing, D.M.J. & Admiraal, W. 1991b. Sensitivity of bacterioplankton in the Rhine River to various toxicants measured by thymidine incorporation and activity of exoenzymes. *Environ. Toxicol. Chemistry*, 10: 1161-1172.
- Tyler, G. 1981. Heavy metals in soil biology and biochemistry. En: "Soil Biochemistry". Paul, E.A. & Ladd, J.N. (Eds.). vol. 5., Marcel Dekker, New York, USA. pp: 317-414.
- Venverloo, L.A.J. 1971. Practical measuring techniques for b-radiation. McMillan. London.

- Viarengo, A. 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Rev. Aquat. Sci.*, 1: 295-
- Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Capell, R. & Orunesu, M. 1981. Effects of copper on the uptake of amino acids, on protein synthesis and on ATP content in different tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.*, 4: 145-152.
- Viarengo, A., Moore, M.N., Mancinelli, G., Mazzucotelli, A. & Pipe, R.K. 1985. Significance of metallothioneins and lysosomes in cadmium toxicity in presence or absence of phenanthrene. *Mar. Environ. Res.*, 17: 184-
- Vissier, J.W.M., Jongeling, A.A.M. & Tanke, H.J. 1979. Intracellular pH determination by fluorescence measurements. *J. Histochem. Cytochem.*, 27: 32-35.
- Visviki, I. & Rachlin, J.W. 1991. The toxic action and interactions of copper and cadmium to the marine alga *Dunaliella minuta*, in both acute and chronic exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 20: 271-275.
- Volesky, B. (Ed.). 1990. "Biosorption of Heavy Metals". CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 1027 pp.
- Volkman, J.K., Smith, D.J. & Eglinton, G. 1981. Sterol and fatty acid composition of four marine haptophycean algae. *J. Mar. Biol. Ass. UK* 61: 509-527.
- Walsh, G. 1988. Principles of toxicity testing with marine unicellular algae. *Environ. Toxicol. Chem.*, 7: 979-987.
- Walsh, G.E. & Merrill, R.G. 1984. Algal bioassays of industrial and energy process effluents. En: "Algae as Ecological Indicators". Shubert, L.E. (Ed.). Academic Press, London. pp: 329-360.
- Walsh, G.E., Duke, K.M. & Foster, R.B. 1982. Algae and crustaceans as indicators of bioactivity of industrial wastes. *Water Res.*, 16: 879-883.
- Watson, J.V., Dive, C. & Workman, P. 1990. Measurement of dynamic cellular events. En: "Flow Cytometry. A Practical Approach." Ormerod, M.G. (Ed.). Oxford University Press, Oxford, U.K. pp: 241-264.

- Weber, C.I. 1971. A guide to the common diatoms at water pollution surveillance system station. U.S. Environmental Protection Agency.
- Werner, D. 1977. Introduction with a note on Taxonomy. En: "The Biology of Diatoms". Botanical Monographs. Vol. 13. Dietrich Werner Ed.
- Whitfield, M. & Turner, D.R. 1987. The role of particles in regulating the composition of seawater. En: "Aquatic surface chemistry, chemical processes at the particle-water interface". Stumm, W. (Ed.). Wiley-Interscience. New York, USA. pp 457-493.
- Whittaker, J. 1978. Efficacy of copper sulphate in the suppression of *Aphanizomenon flos-aquae* blooms in prairie lakes. Environ. Poll., 15: 185-194.
- Wong, S.L. & Beaver, J.L. 1980. Algal bioassays to determine toxicity of heavy metals mixtures. Hydrobiologia, 74: 199-208.
- Wong, P.K. & Chang, L. 1991. Effects of copper, chromium and nickel on growth, photosynthesis and chlorophyll *a* synthesis of *Chlorella pyrenoidosa* 251. Environ. Pollut., 72: 127-139.
- Wood, J.M. 1974. Biological cycles for toxic elements in the environment. Science, 183: 1049-1051.
- Wood, J.M. 1989. Transport, bioaccumulation and toxicity of elements in microorganisms under environmental stress. Proceedings International Conference on Heavy metals in the Environment (Geneve) vol. 1. CEP Consultants Ltd., Edinburg, U.K. pp: 1-12.
- Wright, S.W. & Jeffrey, S.W. 1987. Fucoxanthin pigment markers of marine phytoplankton analysed by HPLC and HPTLC. Mar. Ecol. Prog. Ser. 38: 259-266.
- Wright, S.W., Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Llewellyn, C.A., Bjorland, T., Repeta, D. & Welschmeyer, N. 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. Mar. Ecol. Prog. Ser. 77: 183-196.

-
- Xu, C., Auger, J. & Godvindjee. 1990. Chlorophyll *a* fluorescence measurements of isolated spinach thylakoids obtained by using single-laser-based flow cytometry. *Cytometry*, 11: 349-358.
- Xue, H.-B., Stumm, W. & Sigg, L. 1988. The binding of heavy metals to algal surfaces. *Wat. Res.*, 22: 917-926.
- Yentsch, C.M. & Pomponi, S.A. 1986. Automated individual cell analysis in aquatic research. *Int. Rev. Cytol.*, 105: 183-243.
- Yguerabide, J. & Stryer, L. 1971. Fluorescence spectroscopy of an oriented model membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68: 1217-1221.
- Young, D.R., Jan, T.K. & Hershelman, G.P. 1980. Cycling of zinc in the nearshore marine environment. En: Nriagu, J.O. (ed.). *Zinc in the environment, Part. I. Ecological cycling*. John Wiley & Sons. New York, USA. pp. 297-337.

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Servicio de Bibliotecas



1700744281