



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Máster en Biotecnología Avanzada

**Estudio de la toxicidad provocada
por el contaminante emergente Cloruro de Benzalconio sobre
la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum***

**Estudo da toxicidade provocada
polo contaminante emerxente Cloruro de Benzalconio sobre
a microalga mariña *Phaeodactylum tricornutum***

**Study of the toxicity caused by
the emerging pollutant Benzalkonium Chloride
on the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum***

Mónica Cano Cano

Julio 2021

Máster en Biotecnología Avanzada

Trabajo Fin de Máster

Facultade de Ciencias

Departamento de Bioloxía

Área de Microbioloxía

Estudio de la toxicidad provocada por el contaminante emergente Cloruro de Benzalconio sobre la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum*

Estudo da toxicidade provocada polo contaminante emerxente Cloruro de Benzalconio sobre a microalga mariña *Phaeodactylum tricornutum*

Study of the toxicity caused by the emerging pollutant Benzalkonium Chloride on the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum*

AUTORA:

MÓNICA CANO CANO



Dña. **María Ángeles Cid Blanco**, Catedrática de Universidad del Área de Microbiología del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña, en calidad de tutora de este trabajo, autoriza su presentación y defensa ante el Tribunal Evaluador.

Fdo.: Dña. María Ángeles Cid Blanco

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Ángeles Cid por haberme dado la oportunidad de trabajar con ella durante estos meses y ser la tutora de este trabajo. Gracias por inspirarme y hacer que me siga interesando tanto la microbiología, así como por ayudarme a completar mi formación y cerrar de una forma tan enriquecedora, a nivel personal y profesional, esta etapa.

Gracias a Carmen Rioboo y Rosa García, por ofrecerme su ayuda en todo momento, hacerme sentir tan cómoda en el laboratorio y ser tan amables conmigo siempre.

Y especialmente, gracias a Marta Esperanza y Marta Seoane, por haberme acogido con tanta amabilidad y paciencia desde el primer día en el laboratorio, haber dedicado parte de su tiempo a este trabajo y haberme enseñado tantísimo.

Gracias a Ana, Cami y Curro, por animarme y apoyarme desde la distancia. A Laura, Sara y al resto de personas increíbles que conocí en Galicia, y que hicieron de Coruña mi casa.

Finalmente, y no menos importante por ello, gracias a mis padres, ya que sin ellos y su apoyo incondicional, no habría sido posible toda mi formación académica.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Medio ambiente y contaminantes emergentes.....	1
1.2. Cloruro de benzalconio.....	1
1.3. Indicadores biológicos de calidad ambiental	3
1.4. Parámetros de ecotoxicidad	3
2. OBJETIVOS.....	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS	5
3.1. Phaeodactylum tricornutum	5
3.2. Cultivo microalgal.....	6
3.3. Diseño experimental.....	7
3.3.1. Determinación de la densidad celular	8
3.3.2. Análisis por citometría de flujo: Determinación de la integridad de membrana	8
3.3.3. Determinación espectrofotométrica de pigmentos fotosintéticos	9
3.3.4. Determinación espectrofotométrica de proteínas.....	9
3.3.5. Determinación de la peroxidación lipídica.....	10
3.3.6. Análisis del rendimiento o eficiencia fotosintética, PAM.....	11
3.3.7. Ensayo del cometa con SYBR Green I	11
3.3.8. Estudio de la viabilidad con Ghost Dye Blue 516 con microscopía de fluorescencia	12
3.3.9. Estudio de acúmulos lipídicos citoplasmáticos con microscopía de fluorescencia	12
3.4. Análisis estadístico	13
4. RESULTADOS.....	14

4.1. Crecimiento poblacional y viabilidad	14
4.2. Pigmentos fotosintéticos y eficiencia fotosintética.....	16
4.3 Peroxidación lipídica y ensayo del cometa.....	16
4.4 Proteínas y acúmulos lipídicos	18
5. DISCUSIÓN.....	20
6. CONCLUSIONES.....	25
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , Análisis de la varianza
BAC	Cloruro de Benzalconio
BP-3	Benzofenona-3, <i>benzophenone-3</i>
BSA	Albúmina sérica bovina, <i>bovine serum albumin</i>
CAQ	Compuestos de amonio cuaternario
DEAB	Bromuro de odeciletildimetil-amonio
EC₅₀	Concentración efectiva media, <i>Median Effective Concentration; Effective Concentration 50%</i>
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
FL1	Fluorescencia verde, 505-545 nm
FL2	Fluorescencia amarilla, 560-590 nm
FL3	Fluorescencia anaranjada, 605-635 nm
FL4	Fluorescencia roja, 660-700 nm
<i>i.e</i>	Introduce una explicación
IP	Ioduro de Propidio
MDA	Ácido malondialdehído
PAM	<i>Pulse Amplitude Modulation</i>
PSII	Fotosistema II
QY	<i>Quantum Yield</i> , rendimiento o eficiencia fotosintética
RN	Rojo nilo, <i>red Nile</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno, <i>reactive oxygen species</i>
SARS-Cov-2	Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo
SD	<i>Standard deviation</i> , desviación estándar
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
TCA	Ácido tricloroacético
u.a.	Unidades arbitrarias

RESUMEN

Actualmente las actividades desarrolladas por el ser humano generan una gran cantidad de sustancias tóxicas, algunas de ellas son conocidas como contaminantes emergentes y llegan, en mayor o menor medida, a los ecosistemas acuáticos poniendo en riesgo el equilibrio natural de los océanos y la vida marina. Productores primarios como las microalgas se utilizan a menudo para evaluar la ecotoxicidad de estas sustancias nocivas ya que además de ser microorganismos especialmente sensibles a las perturbaciones del hábitat, son los primeros en establecer contacto con el contaminante cuando éste llega al ecosistema. En el presente estudio se analizó la toxicidad del contaminante emergente cloruro de benzalconio (BAC) sobre la diatomea marina *Phaeodactylum tricorutum*. Cultivos de *P. tricorutum* se expusieron a concentraciones de 0,025 – 0,05 y 0,10 mg L⁻¹ de BAC y se analizaron distintos parámetros fisiológicos tras 24 y 96 horas de exposición mediante técnicas de espectrofotometría, citometría, fluorometría y microscopía de epifluorescencia con el fin de evaluar la toxicidad del BAC. Además, se calculó la concentración efectiva media (EC₅₀) para este compuesto y, mediante el ensayo del cometa, se determinó su efecto genotóxico sobre el material genético microalgal. Los resultados mostraron un estrés celular en respuesta al contaminante ensayado ya que parámetros como la densidad celular, viabilidad, fotosíntesis y concentración celular de proteínas se vieron significativamente comprometidos, siendo los parámetros más sensibles la inhibición del crecimiento celular y el incremento de la actividad fotosintética. Se observaron cambios en la peroxidación lipídica, aunque no fueron estadísticamente significativos. Por último, el rendimiento fotosintético y la integridad de membrana no se vieron afectados.

Palabras clave: cloruro de benzalconio, *Phaeodactylum tricorutum*, contaminantes emergentes, microalgas, toxicidad.

RESUMO

Na actualidade, as actividades levadas a cabo polo ser humano xeran unha gran cantidade de sustancias tóxicas, algunhas delas se coñecen como contaminantes emerxentes e chegan, en maior ou menor cantidade, ós ecosistemas acuáticos, poñendo en risco o equilibrio natural dos océanos e a vida mariña. Productores primarios, como as microalgas, utilízanse para avaliar a ecotoxicidade destas sustancias nocivas xa que, además de ser microorganismos especialmente sensibles ás perturbacións do hábitat, tamén son os primeiros en manter contacto co contaminante cando chega ó ecosistema. Neste estudo analizouse a toxicidade do contaminante emerxente cloruro de benzalconio (BAC) sobre a diatomea mariña *Phaeodactylum tricornutum*. Cultivos desta diatomea foron expostos a concentracións de 0,025 – 0,05 y 0,10 mg L⁻¹ do BAC, e analizáronse distintos parámetros fisiolóxicos ás 24 e 96 horas de exposición mediante técnicas de espectrofotometría, citometría, fluorometría e microscopía de epifluorescencia, coa fin de avaliar a toxicidade do BAC. Ademáis, calculouse a concentración efectiva media (EC₅₀) para este composto e, por medio do ensaio do cometa, determinouse o seu efecto xenotóxico sobre o material xenético microalgal. Os resultados mostraron estrés celular en resposta a o contaminante ensaiado, xa que parámetros como a densidade celular, a viabilidade, a fotosíntese e a concentración celular de proteínas víronse significativamente alterados, sendo os parámetros máis sensibles a inhibición do crecemento celular e o incremento da actividade fotosintética. Observáronse cambios na peroxidación lipídica, aínda que non foron estatisticamente significativos. Por último, o rendimento fotosintético e a integridade de membrana non se viron afectados.

Palabras clave: cloruro de benzalconio, *Phaeodactylum tricornutum*, contaminantes emerxentes, microalgas, toxicidade.

ABSTRACT

Human activities are known to generate large amounts of toxic substances, some of which are commonly known as emerging pollutants. These pollutants, to a greater or lesser extent, end up in the aquatic ecosystems endangering the natural balance of oceans and marine life. Primary producers such as microalgae are often used to evaluate the ecotoxicity of these harmful substances because of their particularly sensitivity to habitat perturbations and because they are the first to establish contact with the pollutant when it reaches the ecosystem. In the present study, we analyse the toxicity of the emerging contaminant benzalkonium chloride (BAC) on the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. Cultures of *P. tricornerutum* were exposed to concentrations of 0.025 - 0.05 and 0.10 mg L⁻¹ of BAC and different physiological parameters were measured after 24 and 96 hours of exposure by spectrophotometry, cytometry, fluorometry and epifluorescence microscopy techniques in order to evaluate the toxicity of BAC. In addition, the median effective concentration (EC₅₀) for this compound was calculated and, using the Comet assay, its genotoxic effect on the microalgal genetic material was determined. The results showed a cellular stress in response to the tested pollutant since parameters such as cell density, viability, photosynthesis and cellular protein concentration were significantly compromised, the most sensitive parameters being cell growth inhibition and increased photosynthetic activity. Changes in lipid peroxidation were observed, although they were not statistically significant. Finally, photosynthetic performance and membrane integrity were not affected.

Keywords: benzalkonium chloride, *Phaeodactylum tricornerutum*, emerging contaminants, microalgae, toxicity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Medio ambiente y contaminantes emergentes

El desarrollo de la actividad antropogénica y el uso inadecuado de ciertas sustancias han puesto en peligro el equilibrio y la estabilidad natural de los ecosistemas acuáticos, que actualmente son receptores de un amplio abanico de contaminantes que ponen en riesgo la vida marina. Esto supone un problema ya que los medios acuáticos ejercen una función clave en el planeta manteniendo el ciclo de los nutrientes (C, P, N, etc.), sustentando la flora y fauna, y conservando, por tanto, la vida y la biodiversidad.

La degradación de los ecosistemas marinos se ha acelerado preocupantemente en los últimos años como consecuencia de escorrentías y vertidos industriales ricos en sustancias biológicamente activas que pueden ejercer efectos tales como la toxicidad sobre los organismos acuáticos, acumulación de contaminantes en el ecosistema, perturbación de las comunidades biológicas, y pérdida de hábitats y biodiversidad (Campanella *et al.*, 2001).

Estas sustancias potencialmente peligrosas se denominan **contaminantes emergentes** y son sustancias tóxicas desconocidas o no reconocidas como tales, cuya presencia en el medio ambiente, sea actual o no, es difícil de detectar puesto que los métodos existentes y disponibles para su análisis son limitados (Míguez *et al.*, 2021).

Tienen origen y naturaleza química variada ya que proceden, entre otros, de productos de uso doméstico o actividades industriales, y no solo son una amenaza para los ecosistemas marinos por sus posibles efectos ecotoxicológicos y toxicológicos, sino también para la salud humana y para las actividades desarrolladas por el hombre, como puede ser, por ejemplo, la explotación de recursos marinos.

1.2. Cloruro de benzalconio

El **cloruro de benzalconio** o **BAC** es una sustancia química perteneciente al grupo de compuestos de amonio cuaternario (CAQ) que posee diversas aplicaciones domésticas,

agrícolas, industriales y sanitarias debido a sus propiedades antimicrobianas de amplio espectro contra bacterias, hongos y virus (Pereira & Tagkopoulos, 2019).

Su toxicidad en ambientes acuáticos fue reconocida en 2006 por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), que desaconsejó su liberación en lagos, océanos y otras aguas. A pesar de ello, su presencia es detectada en aguas residuales y otros ambientes ya es comúnmente utilizado como ingrediente activo de desinfectantes, productos de higiene personal, cosméticos, champús, etc.

Es considerado un contaminante emergente y su toxicidad, al igual que las concentraciones recomendadas o permitidas en los productos comerciales y medio ambiente, varía según su aplicación. A pesar de ello, la incidencia de BAC en el medio ambiente es más elevada que la de otros contaminantes del grupo CAQ, debido probablemente a sus diversas aplicaciones, elevadas tasas de producción y consumo anuales, y a que las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR) no disponen de mecanismos para tratar los contaminantes CAQ, por lo que finalmente se incorporan a los ecosistemas como microcontaminantes, detectándose su presencia en muestras de agua, suelo e incluso de alimentos (Pereira & Tagkopoulos, 2019).

Los CAQ provocan un efecto tóxico en los organismos acuáticos ya que interaccionan con los lípidos de membrana y/o las proteínas transmembrana, comprometiendo la integridad de la membrana plasmática de sus células (Santaeufemia, 2019).

El BAC es uno de los CAQ más dañinos, con mayor presencia en el medio ambiente y más utilizado por las industrias. Además, cabe destacar el posible incremento de los CAQ durante la pandemia del SARS-Cov-2 al tratarse de un compuesto activo en más de 200 desinfectantes recomendados por la EPA para limitar la transmisión del virus (Hora *et. al.*, 2020). Significa, por tanto, que la crisis sanitaria provocada por la covid-19 podría haber aumentado la incidencia de BAC en el medio ambiente y en los océanos.

1.3. Indicadores biológicos de calidad ambiental

Para determinar los efectos ecotoxicológicos que ocasionan los contaminantes en los ecosistemas acuáticos, se llevan a cabo **bioensayos de toxicidad** que permiten estudiar las respuestas fisiológicas de los organismos en presencia del contaminante. Estos bioensayos, test ecotoxicológicos o biotests se definen como métodos de estudio que emplean células vivas, tejidos, organismos o comunidades para evaluar los efectos desencadenados por la exposición a productos químicos (Seoane, 2018).

Los ensayos ecotoxicológicos utilizan microorganismos como indicadores biológicos de la contaminación ya que estos se encuentran en los niveles más inferiores de la cadena trófica, siendo los primeros en ser afectados cuando el contaminante llega al medio acuático, pues están en contacto directo con el medio, separados únicamente por una membrana y/o pared celular (Franqueira *et al.*, 2000).

Las microalgas marinas son microorganismos eucariotas fotosintéticos esenciales para el equilibrio de los medios acuáticos debido a que constituyen la base de la cadena trófica y la principal entrada en energía y nutrientes en el ecosistema. Esto significa que cualquier perturbación en la población fitoplanctónica puede repercutir en la producción primaria y, por tanto, en los niveles más altos de la cadena trófica a través de la bioacumulación del contaminante, alterando, como consecuencia, las estructuras y funciones del ecosistema (Esperanza, 2017).

Por este motivo, así como por su ubicuidad, sensibilidad a gran diversidad de compuestos químicos y rápida respuesta ante cambios ambientales, microalgas como la diatomea *Phaeodactylum tricorutum* son consideradas buenos indicadores de la calidad ambiental y se utilizan habitualmente en los bioensayos de toxicidad (Campanella *et al.*, 2001; Cid *et al.*, 2012).

1.4. Parámetros de ecotoxicidad

El crecimiento o densidad celular es un parámetro general, comúnmente utilizado en los bioensayos de toxicidad con microalgas, para estudiar la relación causa-efecto de una sustancia química (Stauber & Davies, 2000).

Las células en fase de crecimiento exponencial se enfrentan a distintas concentraciones del contaminante durante un periodo de tiempo determinado, monitorizando el crecimiento de las mismas con recuentos celulares por microscopía óptica (cámara de Neubauer) o citometría de flujo, con el fin de evaluar alguna anomalía en la tasa de crecimiento (Esperanza, 2017). A partir de la densidad celular también se puede determinar la concentración efectiva media (EC₅₀, *Median Effective Concentration; Effective Concentration 50%*) para cuantificar el efecto del contaminante.

Las diatomeas son organismos fotosintéticos oxigénicos de gran relevancia en los procesos de producción de O₂ y fijación de CO₂, por lo que el estudio de la actividad fotosintética de *P. tricornutum* en presencia de una sustancia tóxica es especialmente interesante. La inhibición o aumento de la actividad fotosintética, así como el contenido celular de pigmentos fotosintéticos, son parámetros fisiológicos que reflejan con rapidez el efecto tóxico de un compuesto en ciertas algas (Couderchet & Vernet, 2003; Esperanza, 2017, Míguez *et al.* 2021).

La modificación de la actividad peroxidasa es otro parámetro indicativo de la ecotoxicidad puesto que las enzimas de los microorganismos pueden ser inducidas o inhibidas si hay un agente estresante en el medio. En ese caso se desencadena un estrés oxidativo en las células que induce mecanismos antioxidativos enzimáticos y no enzimáticos, utilizados como biomarcadores de toxicidad (Geoffroy *et al.*, 2003).

Algunos compuestos bioquímicos también se utilizan como indicadores de contaminación en microalgas ya que los metabolitos son los productos finales de los procesos de regulación celular y, por tanto, variaciones en los mismos ante la presencia de un contaminante pueden considerarse respuestas a cambios genéticos y ambientales (Jamers *et al.*, 2009a). En el presente estudio se analizó el contenido celular de lípidos y proteínas en presencia de BAC para analizar su efecto nocivo.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es evaluar los efectos toxicológicos del contaminante emergente cloruro de benzalconio sobre la diatomea marina *Phaeodactylum tricornerutum*. Para la consecución de este objetivo general se van a estudiar los parámetros citados anteriormente, y habitualmente utilizados en los ensayos de ecotoxicidad con algas, junto con otros como el análisis de la viabilidad o el estudio de la genotoxicidad a través del ensayo del cometa, empleando técnicas de espectrofotometría, citometría, fluorometría y microscopía de epifluorescencia.

Las propiedades ecotoxicológicas del BAC, así como su presencia en los ecosistemas acuáticos son motivo de preocupación. Urge la necesidad de seguir evaluando el riesgo medioambiental inherente a los contaminantes emergentes y es por eso que con este estudio se pretende contribuir a su conocimiento, utilizando la microalga *P. tricornerutum*, como microorganismo para evaluar la toxicidad de este contaminante acuático.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. *Phaeodactylum tricornerutum*

Para este estudio se seleccionó la especie microalgal *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin (1897) que es una diatomea de agua marina y de distribución global, aunque principalmente costera, propuesta como organismo modelo para ensayos de toxicidad por otros autores puesto que su genoma está secuenciado y es fácil de cultivar en el laboratorio (Martino *et. al.*, 2007).

Pertenece a la clase Bacillariophyceae, orden Naviculales, suborden Phaeodactylinae, familia Phaeodactylaceae y género *Phaeodactylum*. Es una diatomea unicelular, con un tamaño de 1-2 µm de diámetro y 8-12 µm de longitud, diploide en su fase vegetativa y sin evidencias de que presente reproducción sexual. Morfológicamente presenta 3 morfotipos (**Fig. 1**) de distribución global: ovalada, fusiforme y trirradiada, siendo las dos últimas las más características en los cultivos de este estudio (Martin-Jézéquel & Tesson, 2012; Listwan *et al.*, 2018).

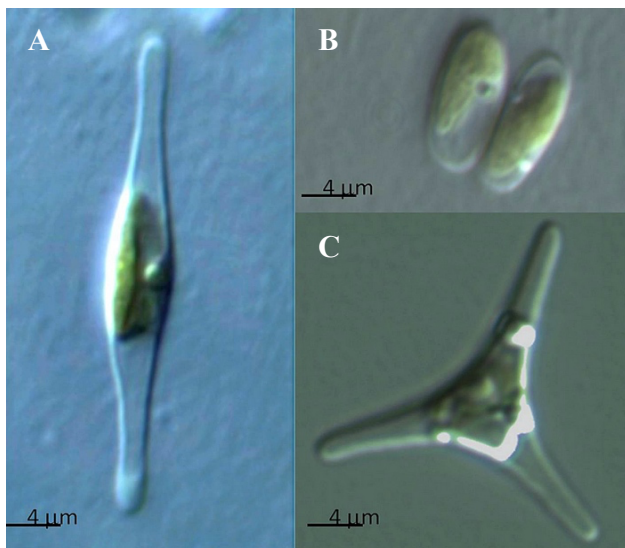


Fig. 1: Imagen de los distintos morfotipos de *Phaeodactylum tricornutum*. Célula fusiforme (A), dos células ovaladas (B) y célula trirradiada (C). Imagen tomada de *National Science Foundation*¹. Créditos: Alessandra De Martino, Ecole Normale Supérieure, Paris.

Esta diatomea desempeña un papel esencial en la fijación del carbono y otros minerales como el silicio, tiene capacidades heterótrofas y puede utilizar una amplia gama de fuentes orgánicas para crecer. Es una especie pleiomórfica ya que su pared celular presenta una atípica baja cantidad de sílice en su composición (Martino *et al.*, 2007), usa leucosina y lípidos como sustancias de reserva, mientras que sus pigmentos característicos son clorofilas *a*, *c*₁, *c*₂, carotenos, fucoxantina, neofucoxantina, diadinoxantina y diatoxantina (Cid, 1993).

La cepa de *P. tricornutum* utilizada en este estudio procede de un cultivo *stock* conservado en condiciones estables en el laboratorio de Microbiología de la Universidade da Coruña, donde se dobla periódicamente para mantener el crecimiento en fase logarítmica. El cultivo *stock* se consiguió aislando la microalga de la ría de Arousa por el Dr. J. Fábregas (Universidad de Santiago de Compostela) y se mantuvo incubando en una cámara a temperatura controlada (18°C), programada con ciclos periódicos de luz y oscuridad y en agitación constante.

3.2. Cultivo microalgal

Para el mantenimiento y crecimiento *P. tricornutum*, se prepararon medios de cultivo con agua de mar natural esterilizada y enriquecida con nutrientes. El agua de mar fue filtrada a través de un filtro de 0,22 μm de tamaño de poro y, posteriormente, esterilizada en el autoclave a 121°C durante 20 minutos. Después se dejó enfriar a temperatura ambiente y, en condiciones de esterilidad, se pasaron 120 mL a un matraz Erlenmeyer, se adicionaron 1,2 μL de la solución nutritiva Algal-1 (Herrero *et al.*, 1991) e inoculó con *P. tricornutum*. Los cultivos preparados se mantenían en las mismas condiciones que el cultivo *stock*.

La composición de la solución de nutrientes Algal-1 es la siguiente:

Macronutrientes (mg L ⁻¹)		Oligoelementos (mg L ⁻¹)		Vitaminas (mg L ⁻¹)	
NaNO ₃	340,00	Citrato férrico	5,00	Tiamina (B1)	0,035
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	31,20	ZnCl ₂	0,14	Cianocobalamina (B12)	0,003
Na ₂ SiO ₃	30,50	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,20	Biotina (B7)	0,005
		Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,24		
		CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,02		
		CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025		

3.3. Diseño experimental

Para estudiar el efecto del BAC sobre *P. tricornutum* se escogieron y prepararon las siguientes concentraciones: **0 mg L⁻¹ (control), 0.025 mg L⁻¹, 0.05 mg L⁻¹ y 0.10 mg L⁻¹** .

Se prepararon, en condiciones de esterilidad, 660 mL totales de agua de mar enriquecida con nutrientes e inoculada con *P. tricornutum* con una densidad inicial de 200.000 células L⁻¹. El volumen total se repartió en 4 frascos de 160 mL, correspondientes a las distintas concentraciones. Cada uno, a su vez, se dividió en 3 matraces Erlenmeyer de 50 mL para tener tres réplicas de cada situación, obteniendo finalmente con un total de 12 matraces para llevar a cabo el ensayo. Las experiencias se realizaron a las 24 a excepción de la densidad celular, EC₅₀ y viabilidad que se analizaron además a las 96 horas.

En cuanto al contaminante, para su preparación, se pesaron 0,002 gramos de BAC (*Benzalkonium Chloride*, formato semisólido, ≥ 95,0%, Fluka, ref. 12060, CAS: 63449-41-2 612-140-00-5) en una balanza de precisión, posteriormente se disolvieron en 5 mL de agua destilada estéril y con una micropipeta se adicionaron las diferentes cantidades del compuesto a los medios de cultivo, inoculados con *P. tricornutum*, para obtener las concentraciones finales establecidas.

3.3.1. Determinación de la densidad celular

La densidad celular (células mL⁻¹) se estudió en cada uno de los tratamientos y para ello se hicieron recuentos celulares de los 12 matraces utilizando una cámara de Neubauer. Los recuentos se hicieron a las 24 y 96 horas de exposición al contaminante.

Con los datos obtenidos se calculó la tasa de crecimiento (μ) expresada en día⁻¹.

$$\mu = [\ln(N_t) - \ln(N_0)] / \ln 2 (t-t_0)$$

Donde t_0 y t = 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.

También se calculó, respecto al control, el porcentaje de inhibición del crecimiento para poder determinar la **concentración efectiva media (EC₅₀)** que es la concentración necesaria de una sustancia tóxica para reducir el crecimiento de la población un 50% (Leboulanger *et. al.*, 2001). La EC₅₀ se calculó mediante interpolación gráfica en las curvas de concentración-respuesta usando el programa *CompuSyn* donde el eje de abscisas representa el logaritmo de las concentraciones de BAC utilizadas y el eje de ordenadas el porcentaje de inhibición del crecimiento de *P. tricornutum* frente a la sustancia ensayada.

3.3.2. Análisis por citometría de flujo: Determinación de la integridad de membrana

Por citometría de flujo se analizó la viabilidad celular mediante tinción con Ioduro de Propidio (IP), fluorocromo comúnmente utilizado en estudios de toxicidad. Este fluorocromo se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos de doble cadena produciendo fluorescencia roja cuando se excita con luz azul (Ormerod, 2000). El IP no puede penetrar las membranas celulares de las células viables que conservan su integridad, pero cuando esta se ve comprometida, el fluorocromo puede atravesarlas y llegar hasta los ácidos nucleicos, donde se ancla. De esta forma puede ser utilizado para discriminar entre células fluorescentes no viables (IP+) y no fluorescentes viables (IP-).

El análisis se realizó en un citómetro CytoFlex B4-R0-V0, provisto con un láser de estado sólido de 488 nm (color azul) de 50 mW y 4 fotodiodos de avalancha para la detección de fluorescencias, que se recogen en los canales FL1 (fluorescencia verde, 505-545 nm), FL2 (fluorescencia amarilla, 560-590 nm), FL3 (fluorescencia anaranjada, 605-635 nm) y FL4 (fluorescencia roja, 660-700 nm). El IP se detecta en la FL3.

Los resultados se muestran en forma de porcentaje, expresando la cantidad de células viables (IP-) con respecto al total de células analizadas.

3.3.3. Determinación espectrofotométrica de pigmentos fotosintéticos

Para evaluar si los pigmentos fotosintéticos se vieron afectados, se hizo una determinación espectrofotométrica. Se centrifugaron 10 mL de cultivo durante 15 minutos a 4500 r.p.m a 4°C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y, para extraer los pigmentos, la biomasa restante se resuspendió en 3 mL de acetona:metanol (2:1), a continuación, la mezcla se mantuvo 24 horas en oscuridad a 4°C. Transcurrido ese periodo de tiempo, las muestras se centrifugaron nuevamente y con el sobrenadante se hizo una lectura de la absorbancia a una longitud de onda (λ) de 664 y 630 nm. Se utilizó un blanco de acetona:metanol y un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700.

Con los resultados obtenidos se calculó la concentración de clorofila *a* y clorofila *c* (c_1+c_2) a partir de las ecuaciones de Jeffrey y Humphrey (1975):

$$\text{Clorofila } a = 11,47 A_{664} - 0,4 A_{630}$$
$$\text{Clorofila } c_1+c_2 = 24,36 A_{630} - 3,73 A_{664}$$

Donde clorofila *a* y clorofila c_1+c_2 = concentraciones de dicho pigmento expresadas en $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extracto mientras que A_{664} y A_{630} = absorbancias medidas a 664 y 630 nm.

3.3.4. Determinación espectrofotométrica de proteínas

Para el análisis de determinación espectrofotométrica de proteínas en *P. tricorntutum* se centrifugaron 10 mL de cultivo durante 15 minutos a 4500 r.p.m y a 4°C, posteriormente se

retiró el sobrenadante y la biomasa restante se resuspendió en 3 mL de H₂O destilada estéril. Para la rotura celular, la mezcla se sometió a 2 min de ultrasonidos con intervalos de descanso de 30 segs y se volvió a centrifugar. Se utilizaron 800 µL del sobrenadante de la muestra y 200 µL del reactivo Bio-Rad para hacer la lectura de la absorbancia, que se midió a 595 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700.

Se utilizó la siguiente recta de calibrado con BSA (5-25 µg mL⁻¹) para medir la concentración de proteínas por le método Bradford (1976):

$$Y = 0,0394 X + 0,0217$$

$$R^2 = 0,99$$

Donde Y = absorbancia medida a 595 nm y X = concentración de proteínas expresada en µg mL⁻¹.

3.3.5. Determinación de la peroxidación lipídica

En este caso se utilizó el método descrito por Heath & Packer (1968), basado en la reacción que se produce entre el ácido tiobarbitúrico (TBA) y el malondialdehído (MDA), que es un producto de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados, dando como resultado un complejo coloreado llamado TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*), que puede medirse por absorbancia a 532 nm (Ersan *et al.*, 2006).

Se centrifugaron 45 mL de cultivo a 4500 r.p.m y a 4°C durante 15 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento resultante en 1 mL de tampón de homogeneización compuesto por ácido tricloroacético (TCA) (0,67%, p/v) en tampón fosfato ajustado a pH=7,09. A continuación, cada muestra se sometió a 2 minutos de ultrasonidos a 400 mA para la rotura celular, la sonicación se hizo en dos ciclos de 1 minuto con descanso en hielo. Después se centrifugó la suspensión y se utilizaron 250 µL del sobrenadante, que se mezclaron con 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) (10%, p/v) y 250 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,67%, p/v) para obtener un volumen final de 1 mL. Esto se incubó durante 30 minutos a 99°C y posteriormente se puso a enfriar en hielo 10 minutos. Las muestras se sometieron a un nuevo

ciclo de centrifugación y, finalmente, se midió la absorbancia del sobrenadante a 532 y 600 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700. El blanco se realizó con TBA y TCA con la misma relación p/v.

3.3.6. Análisis del rendimiento o eficiencia fotosintética, PAM

Se analizó por fluorimetría mediante PAM (*Pulse Amplitude Modulation*) el rendimiento o eficiencia fotosintética (*Quantum Yield, QY*) de los tratamientos objeto de estudio. Para ello se tomaron 3 mL de cultivo de cada matraz y se dejaron en oscuridad durante 30 minutos, después se midió la fluorescencia de cada muestra con el fluorímetro portátil Aquapen C-AP-C100 (*Photon Systems Instruments*).

El fluorímetro ilumina las alícuotas provocando que un exceso de energía no sea utilizado por el fotosistema II (PSII) y sea reemitida como fluorescencia. El dispositivo usa esta fluorescencia para calcular la eficiencia fotosintética o QY, donde a mayor valor de QY, menor será la fluorescencia emitida en condiciones de saturación de luz y, por tanto, será mayor la capacidad fotosintética (Maxwell & Johnson, 2000). De esta forma, las células tendrán un QY elevado si poseen condiciones fotosintéticas óptimas, y un QY menor si se encuentran bajo condiciones de estrés.

3.3.7. Ensayo del cometa con SYBR Green I

Para determinar posibles efectos genotóxicos y daños en el material genético de las células ante la exposición de BAC, se llevó a cabo el ensayo del cometa puesto que con esta técnica es posible detectar roturas de las hebras de ADN.

El protocolo que se siguió fue una modificación del protocolo original descrito por Singh *et al.* (1988), adaptado a microalgas por Erbes *et al.* (1997) y con variación en el método de tinción ya que se utilizó el fluoróforo SYBR Green I (Prado *et al.*, 2009) en lugar de los colorantes habituales, tales como DAPI o bromuro de etileno.

Para ello, se embebieron las células expuestas a BAC en una capa de agarosa sobre un portaobjetos, se llevó a cabo la lisis de las paredes o membranas con un tampón de lisis y

detergentes y, finalmente, se realizó una electroforesis para inducir la migración del ADN, que se observa con la característica forma de un cometa si existe daño.

Se hizo una tinción de las muestras con 50 μL de SYBR *Green* a una concentración final de 100x y se visualizaron los núcleos en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400 equipado con una lámpara de mercurio. Se estudiaron 50 núcleos de cada replica y se calculó el porcentaje de cometas (*i.e.* células con ADN dañado).

3.3.8. Estudio de la viabilidad con *Ghost Dye Blue 516* con microscopía de fluorescencia

Se utilizó el colorante *Ghost Dye Blue 516* para discriminar células viables y no viables mediante microscopía de fluorescencia. Este colorante se une de forma irreversible a las aminos libres de la superficie celular, así como a las intracelulares que quedan expuestas en células con membranas celulares comprometidas. La reacción, y por tanto la fluorescencia emitida, es significativamente mayor en células necróticas que en células viables, lo que permite hacer una distinción entre de ambas.

Para llevar a cabo el protocolo de este ensayo se utilizaron 10 mL de cultivo y 0,5 μL del colorante *Ghost Dye Blue 516* con una incubación posterior de 30 minutos en oscuridad para completar la tinción. Las muestras, una vez preparadas, se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400 equipado con una lámpara de mercurio, donde se seleccionaron un total de 50 células y se contabilizaron las no viables.

3.3.9. Estudio de acúmulos lipídicos citoplasmáticos con microscopía de fluorescencia

Con el fin de detectar estrés celular en *P. tricornutum* se hizo una tinción con el fluorocromo Rojo Nilo (RN), utilizado para visualizar gotas lipídicas citoplasmáticas. RN es un fluorocromo sensible al grado de hidrofobicidad de los lípidos, virando su espectro del rojo al amarillo en presencia de lípidos polares y apolares, respectivamente (Greenspan *et. al.*, 1985; Cooksey *et. al.*, 1987). Si se analizan las células a una longitud de onda ≤ 570 nm se detectan preferentemente ambientes hidrófobos, visualizándose así las reservas lipídicas citoplasmáticas.

Para este ensayo se utilizaron 10 mL de cultivo y 0,5 μ L del colorante *Nile Red* (Sigma-Aldrich) con una posterior incubación de 3 minutos en oscuridad para completar la tinción. Las muestras, una vez preparadas, se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400 equipado con una lámpara de mercurio, donde se seleccionaron un total de 50 células y se contabilizaron las que presentaban acúmulos lipídicos (RN+).

3.4. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos de cada réplica se calcularon las medias y las desviaciones estándar (SD) para cada tratamiento, posteriormente se analizaron los datos estadísticamente con el programa SPSS 27.0 con la finalidad de determinar diferencias significativas. Se realizó un análisis de comparación de medias con una ANOVA de un factor y se aplicó el test de Dunnett de comparaciones múltiples post hoc para conocer qué concentraciones, aplicadas en cada condición estudiada, difieren significativamente respecto al tratamiento control considerando un nivel de significación de $p < 0,05$.

Las gráficas mostradas en este trabajo se realizaron con el paquete de análisis estadístico *SigmaPlot* versión 9.0.

4. RESULTADOS

4.1. Crecimiento poblacional y viabilidad

El crecimiento de *P. tricornutum* se vio negativamente afectado ante las diferentes concentraciones de BAC ensayadas tras 24 y 96 horas de exposición (**Fig. 2**). Se determinó que hay un efecto significativo, respecto al tratamiento control, de las tres concentraciones de contaminante ya que las pruebas estadísticas muestran un nivel de significación $p < 0,05$. A las 24 horas de exposición la inhibición del crecimiento es más evidente que a las 96 horas, donde las concentraciones de 0,05 y 0,10 mg L⁻¹ tienen un efecto similar. Los datos de crecimiento indicados en la gráfica de la **figura 2** se obtuvieron a partir de las tasas de crecimiento (μ).

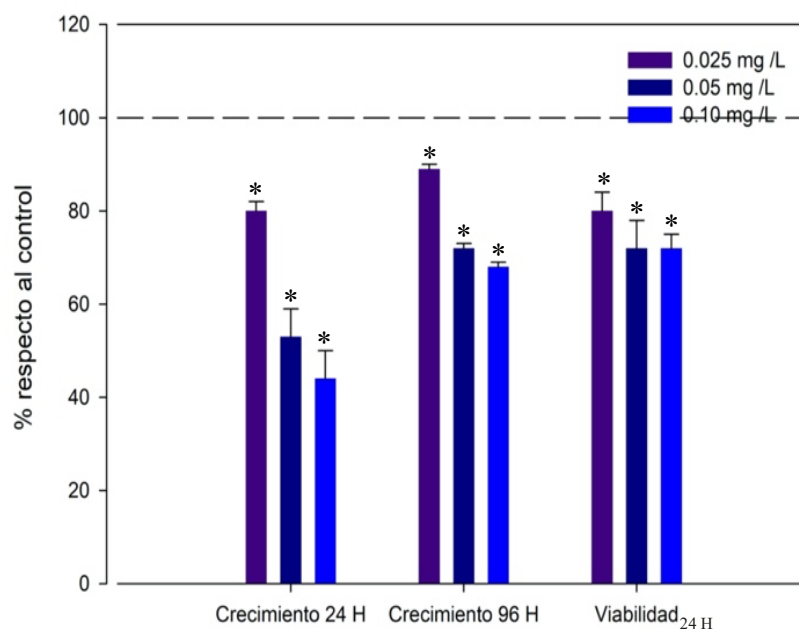


Fig. 2: Tasas de crecimiento y viabilidad de *P. tricornutum* tras 24 y 96 horas de exposición a concentraciones crecientes de BAC. Los datos representan la variación, en forma de porcentaje, respecto al control (100% indicado con una línea discontinua). Los valores expresados se corresponden con la media (u.a.) de las réplicas \pm la desviación estándar. Los resultados significativamente diferentes respecto al control se muestran con un asterisco ($p < 0,05$).

A partir de las densidades celulares calculadas (**tabla 1**) se determinó la EC₅₀, que a las **24 horas** fue de **0.09 mg L⁻¹** y a las **96 horas** de **0.04 mg L⁻¹**.

Tabla 1: Densidades celulares de los cultivos de *P. tricornutum* tras 24 y 96 horas de exposición a 0,025 – 0,05 y 0,10 mg L⁻¹ de BAC. Los datos representados se corresponden con la media (u.a.) de las réplicas ± la desviación estándar. Los resultados que muestran diferencias significativas respecto al control se indican con un asterisco (p < 0,05).

Cloruro de benzalconio (mg L ⁻¹)	Crecimiento celular (cél x 10 ⁵ mL ⁻¹)	
	24 horas	96 horas
Control	6,23 ± 0,10	91,8 ± 13,7
0,025	4,95 ± 0,13 *	69,33 ± 5,9 *
0,05	3,60 ± 0,26 *	33,58 ± 1,9 *
0,10	3,23 ± 0,24 *	32,41 ± 5,5 *

La viabilidad, analizada con *Ghost Dye Blue 516*, se vio afectada por el efecto tóxico del BAC ya que el porcentaje de células vivas observables a microscopía disminuyó a concentraciones crecientes de contaminante; sin embargo, no se encontraron grandes diferencias entre las concentraciones 0,05 y 0,10 mg L⁻¹ donde el número de células vivas que se contabilizó fue similar. Las tres concentraciones mostraron diferencias significativas respecto al control (p < 0,05).

Los datos de viabilidad representados en la **figura 2** se obtuvieron a partir del análisis celular mediante microscopía de epifluorescencia para discriminar células viables y no viables, tal y como se muestra en la **figura 3**.

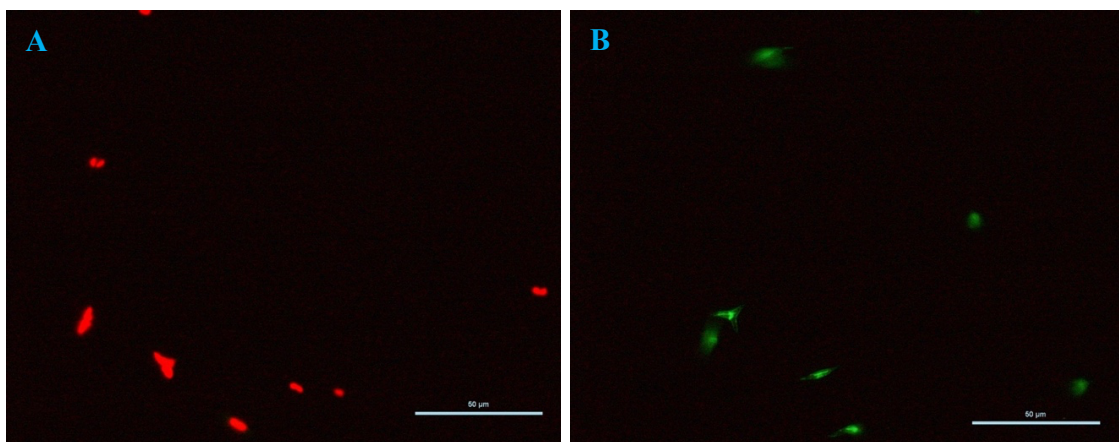


Fig. 3: Imagen a microscopía de epifluorescencia de muestras celulares teñidas con *Ghost Dye Blue 516* para discriminar células **viables** en color rojo (A) y **no viables** en color verde (B).

4.2. Pigmentos fotosintéticos y eficiencia fotosintética

El contenido celular de clorofila *a* (Fig. 4) aumentó en los cultivos expuestos a concentraciones entre 0,025 y 0,10 mg L⁻¹ de BAC después 24 horas, destacando un incremento mayor en la concentración más alta, que muestra diferencia significativa respecto al tratamiento control ($p < 0,05$). El rendimiento fotosintético (PAM), sin embargo, no mostró cambios significativos.

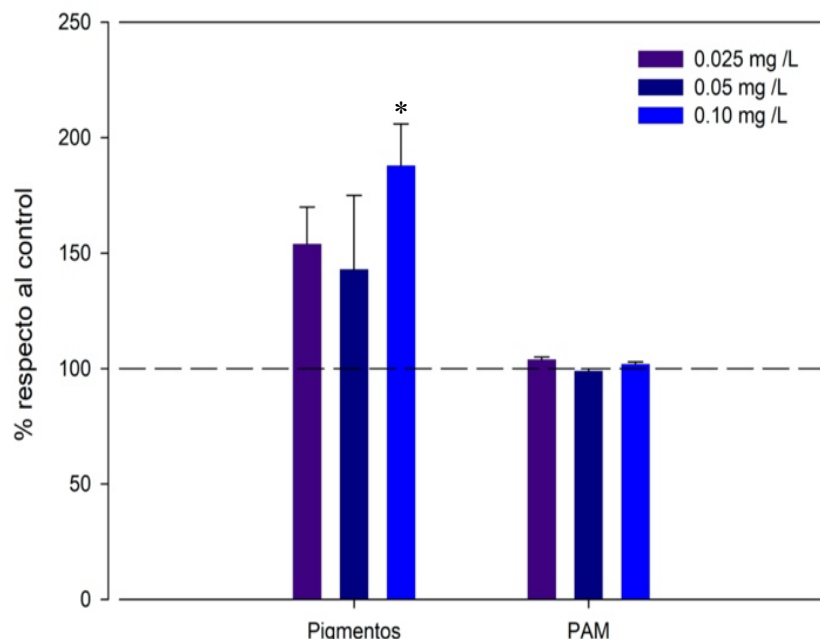


Fig. 4: Concentración de pigmentos fotosintéticos y rendimiento fotosintético (PAM) de *P. tricornutum* tras 24 horas de exposición a concentraciones crecientes de BAC. Los datos representan la variación, en forma de porcentaje, respecto al control (se le asigna el valor del 100% indicado con una línea discontinua). Los valores expresados se corresponden con la media (u.a.) de las réplicas \pm la desviación estándar. Los resultados significativamente diferentes respecto al control se muestran con un asterisco ($p < 0,05$).

4.3 Peroxidación lipídica y ensayo del cometa

En la figura 5 se muestra el aumento, respecto al cultivo control, de la peroxidación lipídica en todos los cultivos tratados. Se aprecia que los cultivos expuestos a 0,025 mg L⁻¹ de contaminante sufren un incremento menos acentuado que los expuestos a 0,05 y 0,10 mg L⁻¹ de BAC. Las pruebas estadísticas mostraron que no existían diferencias significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los tratamientos ensayados.

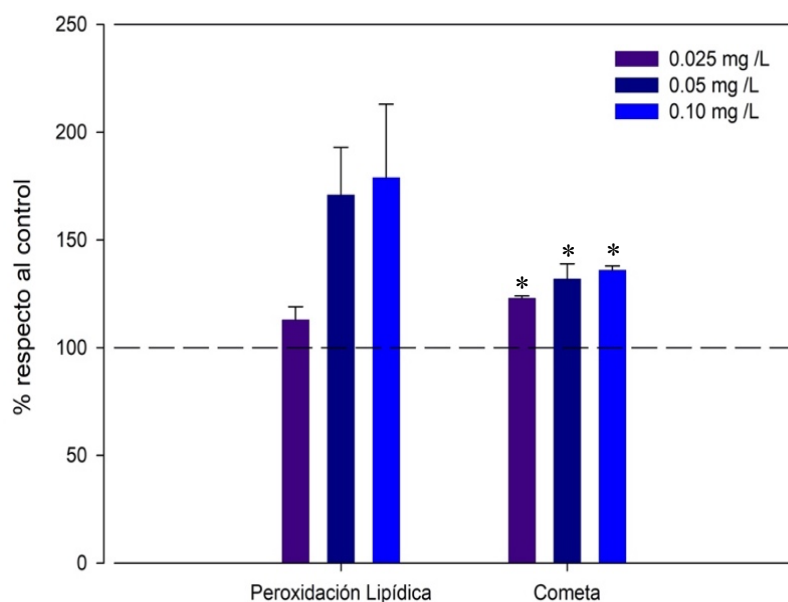


Fig. 5: Peroxidación lipídica y ensayo del cometa en *P. tricornutum* tras 24 horas de exposición a concentraciones crecientes de BAC. Los resultados representan la variación, en forma de porcentaje, respecto al control (100% indicado con una línea discontinua). Los valores expresados se corresponden con la media (u.a.) de las réplicas \pm la desviación estándar. Los resultados que muestran diferencias significativas respecto al control aparecen con un asterisco ($p < 0,05$).

En la misma figura se puede observar el daño provocado por el contaminante en el material genético (ADN), que fue mayor a medida que aumentó la concentración del compuesto. Los datos representados se obtuvieron tras realizar el ensayo del cometa, donde por microscopía de epifluorescencia se visualizaron las células con el material genético comprometido al presentar la característica forma de un cometa, tal y como se muestra en la **figura 6**.

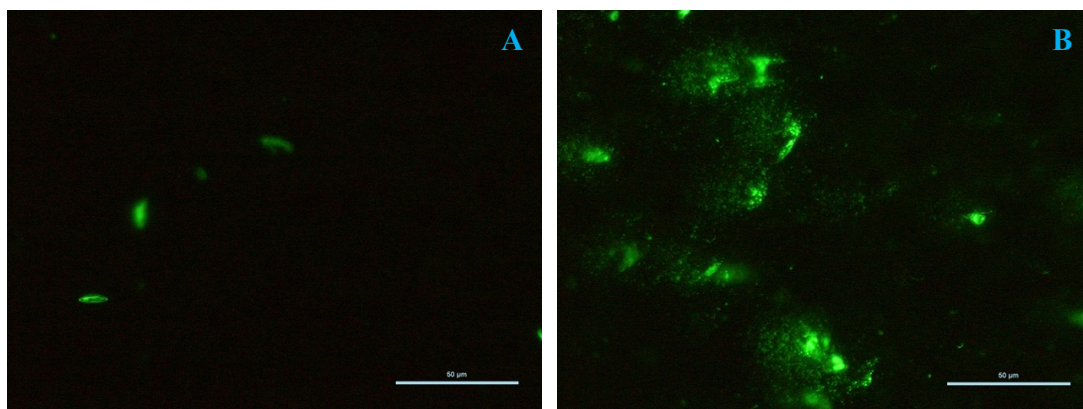


Fig. 6: Imagen de núcleos de células lisadas después de la electroforesis, procedentes de cultivos expuestos a 0,10 mg L⁻¹ de BAC, **(B)** y células intactas procedentes del tratamiento control **(A)**. Los cultivos estuvieron 24 horas expuestos a concentraciones crecientes del contaminante.

4.4 Proteínas y acúmulos lipídicos

La exposición de las células al cloruro de benzalconio provocó alteraciones de la concentración celular de proteínas (Fig. 7). Se observó un aumento en proporción directa a las concentraciones crecientes expuestas. Los análisis estadísticos pusieron en evidencia diferencias significativas ($p < 0,05$) en todos los tratamientos respecto al control.

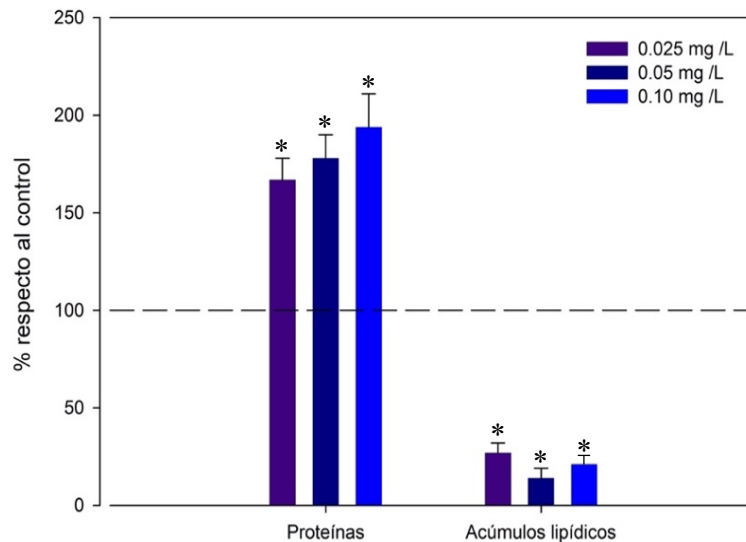


Fig. 7: Proteínas y acúmulos lipídicos de *P. tricornutum* tras 24 horas de exposición a concentraciones crecientes de BAC. Los resultados representan la variación, en forma de porcentaje, respecto al control (100% indicado con una línea discontinua). Los valores expresados se corresponden con la media (u.a.) de las réplicas \pm la desviación estándar. Los resultados significativamente diferentes respecto al control aparecen con un asterisco ($p < 0,05$).

El estudio por microscopía de epifluorescencia de los acúmulos lipídicos celulares mostró una disminución de los mismos en todas las concentraciones ensayadas, determinándose mediante tests estadísticos diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al tratamiento control en todas las situaciones. Destaca una disminución mayor en los cultivos expuestos a $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de BAC.

Los datos, utilizados para realizar la gráfica de gotas lipídicas citoplasmáticas que se muestra en la figura 7, se analizaron como porcentaje de células que contenían acúmulos lipídicos (RN+) respecto al total de células contabilizadas que representaban el 100%. En la figura 8 puede visualizarse en color naranja intenso la presencia de acúmulos lipídicos (RN+) en los extremos de células trirradiadas y fusiformes de *P. tricornutum*.

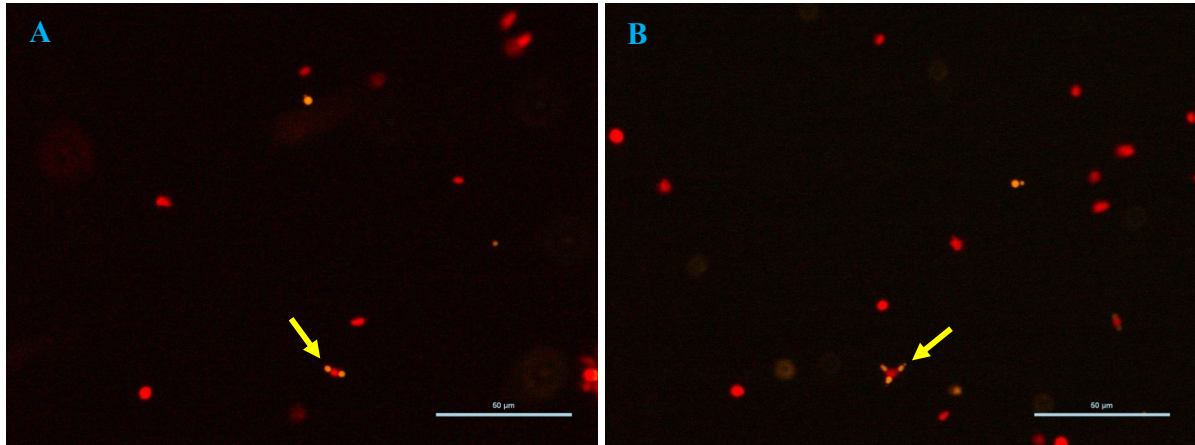


Fig. 8: Imagen de gotas lipídicas (RN+) intracelulares observadas por microscopia de fluorescencia en *P. tricornutum*. A la izquierda (**A**) se observan acúmulos lipídicos en los extremos de una célula fusiforme y a la derecha (**B**) en los extremos de una célula trirradiada después de 24 horas de exposición a BAC.

4.5. Integridad de membrana por citometría de flujo

La integridad de membrana analizada por citometría de flujo se mantuvo por encima del 98% en todos los cultivos de *P. tricornutum* y no mostró efectos significativos ($p > 0,05$) en ninguna de las concentraciones estudiadas. En la **figura 9** pude observarse una muestra control y una muestra expuesta a $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de BAC, en ambas la viabilidad celular es superior al 99%.

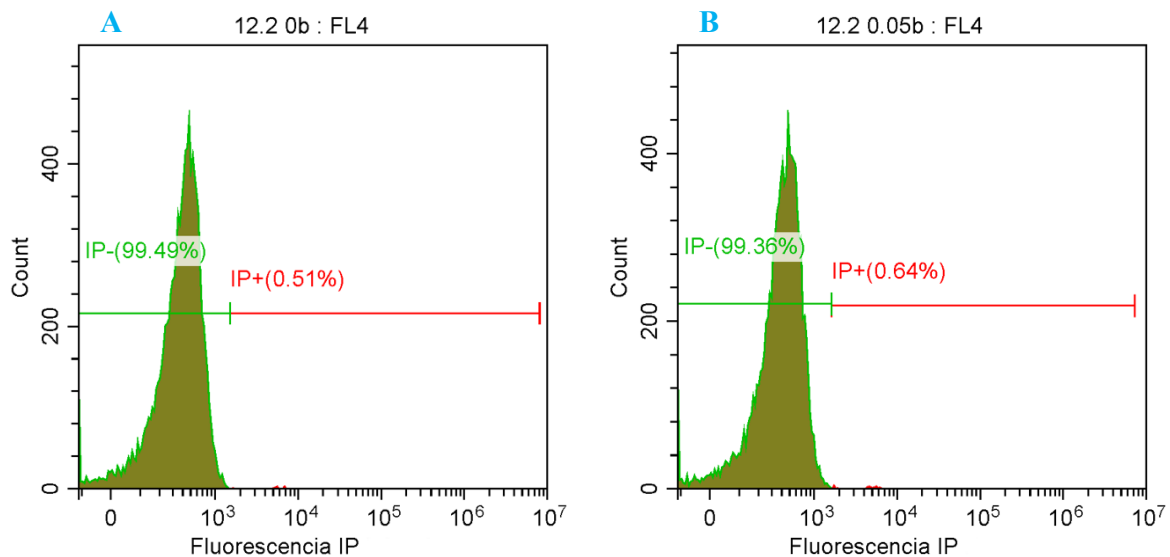


Fig. 9: Gráficos de viabilidad celular de un cultivo control (**A**) y un cultivo expuesto a $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de BAC (**B**). En el eje de ordenadas (Y) se representa el número de eventos y en el eje de abscisas (X) la fluorescencia emitida por el yoduro de propidio (IP), representando la primera franja de color verde (IP-) el porcentaje de eventos de células viables y la segunda franja de color rojo (IP+) el porcentaje eventos de células no viables.

5. DISCUSIÓN

El BAC es un contaminante emergente presente en los ecosistemas acuáticos ya que se encuentra en una gran diversidad de productos cotidianos y de uso profesional. Debido a sus excesivas y numerosas aplicaciones, inadecuada gestión cuando se transforma en un residuo y a las propias características de los compuestos CAQ que hacen que su tratamiento en las EDAR sea ineficiente, esta sustancia química acaba integrándose en los océanos, donde ejerce un efecto nocivo en la biota que los habita.

En el presente estudio se utilizó la diatomea *P. tricornutum* como indicador de toxicidad del BAC. Para evaluar el efecto dañino del contaminante sobre este microorganismo se analizaron distintos parámetros fisiológicos.

La densidad celular es uno de los bioindicadores empleados con más frecuencia en estudios de ecotoxicidad, al tratarse de una respuesta sensible y rápida de las microalgas ante la presencia de una sustancia tóxica. Los resultados obtenidos a partir de este parámetro concluyeron que el BAC ejerce una respuesta directa en el crecimiento celular de *P. tricornutum*, provocando una drástica inhibición del mismo a concentraciones crecientes de contaminante tras 24 horas de exposición. Esto sucedió previamente en estudios con BAC, llevados a cabo por Elersek *et al.* (2018) en *Pseudokirchneriella subcapitata* y por Beveridge *et al.* (1998) en nueve especies de diatomeas marinas. Lavorgna *et al.* (2015) también analizó este parámetro en pequeños crustáceos como *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia*. En todas las situaciones se observó una reducción significativa del crecimiento a corto plazo en presencia del contaminante.

Investigaciones desarrolladas por Míguez *et al.* (2021) pusieron de manifiesto la inhibición del crecimiento en *Chlamydomonas reinhardtii* ante la presencia de otros contaminantes emergentes como la benzofenona-3 (BP-3), lo que reafirma que ante una situación de estrés este parámetro es uno de los más sensibles en microalgas ya que, independientemente del compuesto, se genera la misma respuesta citotóxica.

Valores similares de la EC₅₀ a los obtenidos con *P. tricornutum* en este trabajo, aparecieron en el estudio de Elersek *et al.* (2018) con *P. subcapitata*, donde la concentración efectiva media

también fue de 0.04 mg L⁻¹ de BAC. Beveridge *et al.* (1998) reveló una EC₅₀ algo inferior en otras diatomeas marinas como *Melosira nummuloides*, *Amphora coffeaeformis*, *Nitzschia incrustans*, *Navicula hansen*, *Cylindrotheca closterium*, *Achnanthes* sp., *Opephora* sp., *Navicula* sp., *Amphora* sp. confirmando el efecto tóxico del BAC sobre el crecimiento celular de las microalgas.

Se deduce, con los datos obtenidos, que el efecto tóxico del BAC sobre *P. tricorutum* se incrementó con el tiempo, como lo demuestra la disminución de la EC₅₀ a las 96 horas de exposición.

El porcentaje de células viables y no viables, discriminadas con técnicas de epifluorescencia, puso en evidencia una respuesta negativa sobre la viabilidad celular, que disminuye significativamente a partir de la concentración más pequeña. Estos datos están de acuerdo con Míguez *et al.* (2021) que obtuvieron resultados similares en ensayos de viabilidad con *C. reinhardtii* y diversos contaminantes emergentes.

La capacidad fotosintética es otro parámetro, especialmente sensible en microalgas, que puede verse fácilmente alterado. En este estudio *P. tricorutum* sufrió un aumento significativo en la concentración de pigmentos fotosintéticos en aquellos cultivos expuestos a 0,10 mg L⁻¹ de contaminante.

Resultados semejantes se observaron en las células de *C. reinhardtii* (Esperanza *et al.* 2019 & Míguez *et al.*, 2021) y *Tetraselmis suecica* (Seoane *et al.*, 2017) expuestas a BP-3, donde la fluorescencia de la clorofila *a* se incrementó ante la presencia del contaminante. Esto puede deberse a un bloqueo de la cadena de electrones en el PSII, tal y como indicaron los estudios de Singh & Singh (1987), Samson & Papovic (1988), Murthy *et al.* (1990), y Cid *et al.* (1995) o al aumento del volumen y complejidad celular como sugirieron Esperanza *et al.* (2019) y Seoane *et al.* (2017) en sus investigaciones.

A pesar de ser un parámetro fisiológico de gran sensibilidad, la respuesta fotosintética de las microalgas expuestas a un contaminante no muestra una tendencia tan clara como la densidad

celular o tasa de crecimiento, donde la mayoría de los ensayos reflejan como respuesta habitual una reducción de las mismas. El aumento o inhibición de la actividad fotosintética depende del tipo de microalga así como de los mecanismos para lidiar con el contaminante, ya que en contraposición a los resultados obtenidos en el presente estudio, Pérez *et al.* (2009) observó que a mayores concentraciones de BAC en *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracilis*, mayor inhibición de la fotosíntesis, al igual que Sánchez-Fortún *et al.* (2008) en *Scenedesmus intermedius* y *Dictiosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) con bromuro de odeciletildimetil-amonio (DEAB), que es otro CAQ ampliamente utilizado como desinfectante.

Los resultados sobre la peroxidación lipídica indicaron un incremento del estrés oxidativo, relacionado con la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS), que generan importantes daños tisulares (Ben Ouada *et al.*, 2018). Esto puede interpretarse como un signo de presión ambiental generado por el contaminante. A pesar de la variación, los datos no mostraron cambios significativos ($p > 0,05$). Sin embargo, el efecto negativo sobre este parámetro se manifestó anteriormente en otras microalgas expuestas a herbicidas, metales pesados y productos de cuidado personal (Jamers *et al.*, 2009b; Soto *et al.*, 2011; Prado *et al.*, 2012a, 2012b; Mofeed & Mosleh, 2013; González-Pleiter *et al.*, 2017; Xiang *et al.*, 2018; Almeida *et al.*, 2019 y Esperanza *et al.*, 2019).

Míguez *et al.* (2021) señaló que el incremento de los niveles de estrés oxidativo en microalgas expuestas a contaminantes puede relacionarse, entre otras cosas, con la disminución de la tasa de crecimiento y viabilidad celular.

Se observó un incremento de la concentración celular de proteínas dependiente de la concentración de BAC, mostrándose, de esta forma, una respuesta metabólica de las células expuestas a la toxicidad del contaminante. El aumento del metabolismo activo de proteínas podría relacionarse con el posible aumento del tamaño celular y consecuente incremento de la actividad fotosintética. Míguez *et al.* (2021) observaron previamente un aumento de tamaño, complejidad celular y modificación morfológica en células de *C. reinhardtii* expuestas a BP-3. Resultados similares aparecieron en *T. suecica* expuesta a omeprazol (Seoane *et al.*, 2017).

Las gotas lipídicas citoplasmáticas están compuestas principalmente por triacilglicéridos y ésteres de colesterol (Martin & Parton, 2006) y aparecen como una respuesta celular ante condiciones de estrés debido a la alteración del metabolismo de ácidos grasos (Gastaldi *et al.*, 2007; Solovchenko, 2012; Zienkiewicz *et al.*, 2016). El incremento de reservas lipídicas en microalgas fue analizado anteriormente por Matthew *et al.* (2009) y Urzica *et al.* (2013), sin embargo, en el presente estudio el porcentaje de acúmulos lipídicos fue inferior respecto al tratamiento control. Esto podría deberse a que los compuestos lípidos se acumulan cuando cesa el crecimiento celular, sin embargo este ensayo se llevó a cabo a las 24 horas de cultivo, situación en la que el crecimiento había disminuido pero no detenido por completo.

Investigaciones llevadas a cabo por Ferk *et al.*, (2005) demostraron que el BAC interacciona con el ADN y los cromosomas, induciendo cambios en el material genético. En este trabajo se comprobó el efecto genotóxico sobre las células microalgales expuestas a BAC mediante la prueba del cometa, que puso en evidencia roturas en la estructura primaria del ADN debidas al estrés oxidativo (Prado *et al.*, 2009). Los resultados coinciden con Lavorgna *et al.* (2015), que observó la genotoxicidad de este mismo contaminante sobre el material genético de *D. magna* y *C. dubia*. Efectos semejantes aparecieron en células de mayor complejidad como hepatocitos primarios de rata (Ferk *et al.*, 2007) y células epiteliales respiratorias humanas (Deutschle *et al.*, 2006) en ensayos con BAC.

En la microalga *C. reinhardtii* se detectaron daños en el ADN cuando las células fueron expuestas a BP-3 por (Anido, 2019) La misma situación se observó en la diatomea *Chaetoceros tenuissimus* en presencia de metales pesados (Desai *et al.*, 2006).

Otro parámetro con el que se evaluó el efecto del contaminante fue la integridad de membrana, ya que en estudios de Cid *et al.* (1996) y Soares *et al.* (2020) las propiedades de la membrana sufrieron cambios significativos cuando las células de *P. tricornutum* se expusieron a condiciones citotóxicas. En nuestro estudio los resultados determinaron que más del 98% de las células tenían la membrana intacta (IP-) y que no había diferencias significativas respecto al tratamiento control, poniendo en evidencia que la estabilidad de la membrana celular no se vio afectada ante la presencia de BAC. Esto coincide con investigaciones anteriores donde la

membrana de la microalgas *T. suecica* y *C. reinhardtii* no se vio alterada en presencia de distintas sustancias químicas bioactivas (Seoane *et al.*, 2014 & Esperanza *et al.*, 2015), hecho que podría deberse a ajustes metabólicos o a la estimulación de mecanismos de defensa antioxidantes de las microalgas, como la activación de vacuolas autofágicas y/o la inducción de enzimas antioxidantes, con el fin de garantizar la supervivencia de las células (Dewez *et al.*, 2005; Chankova *et al.*, 2014 & Esperanza, 2017).

Torres *et. al.* (1995) realizó ensayos con células de *P. tricornutum* enfrentadas a cadmio, y al igual que en el presente estudio, se observó una inhibición en el crecimiento celular pero los ensayos de integridad de membrana no mostraron cambios significativos.

A pesar de que muchos de nuestros resultados están de acuerdo con ensayos previos centrados en la interacción de BAC con diferentes microalgas, así como con investigaciones realizadas propiamente con *P. tricornutum* expuesta a otros contaminantes, lo cierto es que la disparidad de resultados podría deberse al mecanismo de acción que ejercen las diversas sustancias citotóxicas sobre *P. tricornutum* y a los mecanismos fisicoquímicos y biológicos de las microalgas para lidiar con el BAC u otros compuestos tóxicos.

De acuerdo con los resultados de este trabajo, queda demostrado el efecto citotóxico del BAC en *P. tricornutum*. Aún así, se requieren más estudios sobre otros organismos para evaluar la ecotoxicidad de este contaminante emergente en el medio ambiente y en la salud humana, especialmente a largo plazo, conociendo mejor las propiedades químicas de los CAQ, su biodisponibilidad, mecanismos de acción, incorporación a la cadena trófica y posible interacción con otros compuestos químicos.

6. CONCLUSIONES

1. Entre las concentraciones 0,025 y 0,10 mg L⁻¹, el BAC ejerce un efecto tóxico significativo sobre *P. tricornutum*, siendo los parámetros relacionados con la viabilidad, concentración celular de clorofila *a* y densidad celular los más comprometidos, en contraposición con la integridad de membrana de las células y la eficiencia fotosintética, que no registran variaciones en las condiciones ensayadas. Tras calcularse la EC₅₀ a las 24 y 96 horas, se observó una disminución de la misma en la segunda medición, lo que pone de manifiesto el efecto nocivo dependiente del tiempo.
2. El efecto genotóxico del contaminante queda demostrado con el ensayo del cometa, donde se observó su capacidad de acceder e interactuar con el material genético de *P. tricornutum*, dañando las hebras de ADN de las células expuestas a las concentraciones ensayadas.
3. La toxicidad del BAC influye en el metabolismo celular, provocando estrés en los cultivos expuestos, que conlleva un incremento directo de la concentración celular de proteínas. Se observó un aumento no significativo de la peroxidación lipídica.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, A.C., Gomes, T., Langford, K., Thomas, K.V. & Tollefsen, K.E. (2019). Oxidative stress potential of the herbicides bifenox and metribuzin in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, **210**, 117–128.

Anido Valera, L. (2019). Impacto citotóxico de dos filtros UV de tipo benzofenona sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii*. Trabajo Fin de Máster. Universidade da Coruña.

Ben Ouada, S., Ben Ali, R., Leboulanger, C., Ben Ouada, H. & Sayadi, S. (2018). Effect of Bisphenol A on the extremophilic microalgal strain *Picocystis* sp. (*Chlorophyta*) and its high BPA removal ability. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **158**, 1–8.

Beveridge, C. M., Parr, A. C. S., Smith, M. J., Kerr, A., Cowling, M. J. & Hodgkiess, T. (1998). The effect of benzalkonium chloride concentration on nine species of marine diatom. *Environmental Pollution* **103**, 31–36.

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

Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, M. P. & Saoncella, A., (2001). An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Research*, **35**, 69–76.

Cid Blanco, Á. (1993). Toxicidad del cobre sobre la diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. Tesis doctoral. Universidade da Coruña.

Cid, Á., Herrero, C., Torres, E. & Abalde, J., (1995). Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic Toxicology*, **31**, 165–174.

Cid, Á., Fidalgo, P., Herrero, C. & Abalde, J., (1996). Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry. *Cytometry*, **25**, 32–36.

Cid, Á., Prado, R., Rioboo, C., Suarez-Bregua, P. & Herrero, C. (2012). Use of Microalgae as Biological Indicators of Pollution: Looking for New Relevant Cytotoxicity Endpoints. En: Johnsen, M. N. (ed.) *Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy*. Nova Science Publishers, New York. pp: 311–323.

Cooksey, K. E., Guckert, J. B., Williams, S. A. & Callis, P. R. (1987). Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *Journal of Microbiological Methods*, **6**, 333–345.

Couderchet, M. & Vernet, G., (2003). Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **55**, 271–277.

Chankova, S.G., Dimova, E.G., Mitrovska, Z., Miteva, D., Mokerova, D.V., Yonova, P.A. & Yurina, N.P. (2014). Antioxidant and HSP70B responses in *Chlamydomonas reinhardtii* genotypes with different resistance to oxidative stress. *Ecotoxicology Environmental Safety*, **101**, 131–137

Desai, S. R., Verlecar, X. N., Nagarajappa & Goswami, U. (2006). Genotoxicity of cadmium in marine diatom *Chaetoceros tenuissimus* using the alkaline Comet assay. *Ecotoxicology*, **15** (4), 359–363.

Deutschle, T., Porket, U., Reiter, R., Keck, T. & Riechelmann, H. (2006). In vitro genotoxicity and cytotoxicity of benzalkonium chloride. *Toxicology in Vitro*, **20** (8), 1472–1477.

Dewez, D., Geoffroy, L., Vernet, G. & Popovic, R., (2005). Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquatic Toxicology*, **74**, 150–159.

Elersek, T., Ženko, M. & Filipič, M. (2018). Ecotoxicity of disinfectant benzalkonium chloride and its mixture with antineoplastic drug 5-fluorouracil towards alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *PeerJ*, **6**, 1–14.

Erbes, M., Wessler, A., Obst, U. & Wild, A. (1997). Detection of primary DNA damage in *Chlamydomonas reinhardtii* by means of modified microgel electrophoresis. *Environmental and molecular mutagenesis*, **30**(4), 448–458.

Ersan, S., Bakir, S., Ersan, E.E. & Dogan, O. (2006). Examination of free radical metabolism and antioxidant defence system elements in patients with obsessive–compulsive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **30**, 1039–1042.

Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C. & Cid, Á. (2015). *Chlamydomonas reinhardtii* cells adjust the metabolism to maintain viability in response to atrazine stress. *Aquatic Toxicology*, **165**, 64–72.

Esperanza Llera, M. (2017). Toxicidad ejercida por contaminantes acuáticos sobre microalgas de agua dulce. Tesis doctoral. Universidade da Coruña.

Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C. & Cid, Á. (2019). Differential toxicity of the UV-filters BP-3 and BP-4 in *Chlamydomonas reinhardtii*: A flow cytometric approach. *Science of The Total Environment*, **669**, 412–420.

Ferk, F., Sanchez-Fortun, S., Llorente, M.T. & Castaño, A. (2005). Genotoxic effects of selected biocides on RTG-2 fish cells by means of a modified fast micromethod assay. *Aquatic Toxicology*, **73** (1), 55–64.

Ferk, F., Misík, M., Hoelzl, C., Uhl, M., Fuerhacker, M., Grillitsch, B., Parzefall, W., Nersesyán, A., Micieta, K., Grummt, T., Ehrlich, V. & Knasmüller, S. (2007). Benzalkonium chloride (BAC) and dimethyldioctadecylammonium bromide (DDAB), two common quaternary ammonium compounds, cause genotoxic effects in mammalian and plant cells at environmentally relevant concentrations. *Mutagenesis*, **22** (6), 363–370.

Franqueira, D., Orosa, M., Torres, E., Herrero, C. & Cid, Á., (2000). Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. *Science of the Total Environment*, **247**, 119–126.

Gastaldi, L., Ranzato, E., Capri, F., Hankard, P., Pérès, G., Canesi, L., Viarengo, A. & Pons, G. (2007). Application of a biomarker battery for the evaluation of the sublethal effects of pollutants in the earthworm *Eisenia andrei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **146** (3), 398–405.

Geoffroy, L., Dewez, D., Vernet, G. & Popovic, R., (2003). Oxyfluorfen toxic effect on *S. obliquus* evaluated by different photosynthetic and enzymatic biomarkers. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*, **45**, 445–452.

González-Pleiter, M., Rioboo, C., Reguera, M., Abreu, I., Leganés, F., Cid, Á. & Fernández- Piñas, F. (2017). Calcium mediates the cellular response of *Chlamydomonas reinhardtii* to the emerging aquatic pollutant Triclosan. *Aquatic Toxicology*, **186**, 50–66.

Greenspan, P., Mayer, E. P. & Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of cell biology*, **100**(3), 965–973.

Heath, R.L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry Biophysics*, **125**, 189–198.

Herrero, C., Cid, Á., Fábregas, J. & Abalde, J. (1991). Yields in biomass and chemical constituent of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquacultural Engineering*, **10** (2), 99–110.

Hora, P. I., Pati, S. G., McNamara, P. J. & Arnold, W. A. (2020). Increased Use of Quaternary Ammonium Compounds during the SARS-CoV-2 Pandemic and Beyond: Consideration of Environmental Implications. *Environmental Science & Technology Letters*, **7**, 622–631.

Jamers, A., Blust, R., & De Coen, W. (2009a). Omics in algae: paving the way for a systems biological understanding of algal stress phenomena? *Aquatic Toxicology*, **92**, 114–121.

Jamers, A., Lenjou, M., Deraedt, P., Van Bockstaele, D., Blust, R. & de Coen, W. (2009b). Flow cytometric analysis of the cadmium-exposed green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *European Journal of Phycology*, **44**, 541–550.

Jeffrey, SW., Humphrey, GF. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochimie und Physiologie der Pflanzen*, **167**(2), 191–194.

Lavorgna, M., Russo, C., D'Abrosca, B., Parrella, A. & Isidori, M. (2015). Toxicity and genotoxicity of the quaternary ammonium compound benzalkonium chloride (BAC) using *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* as model systems. *Environmental Pollution*, **210**, 34–39.

Leboulanger, C., Rimet, F., de Lacotte, M.H. & Bérard, A. (2001). Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae. *Environment International*, **26**, 131–135.

Listwan, S., Tokarek, W., Kleszcz, K., Chowanec, M., Porębska, Z., Krawczyk, K., Bojko, M. & Latowski, D. (2018). *Phaeodactylum tricorutum* as a Potential Phytoremediator of Sea and Fresh Waters. En: *Proceedings of the 4th World Congress on New Technologies (NewTech'18)*, Madrid, pp: 147-1 – 147-5.

Martin-Jézéquel, V. & Tesson, B. (2012). 3 *Phaeodactylum tricorutum* polymorphism: an overview. En K. Heimann & C. Katsaros (Ed.), *Advances in Algal Cell Biology*. Berlin, Boston. De Gruyter, pp: 43 – 80.

Martin, S. & Parton, R. G. (2006). Opinion: Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **7** (5), 373.

Martino, A. D., Meichenin, A., Shi, J., Pan, K. & Bowler, C. (2007). Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) accessions¹. *Journal of Phycology*, **43** (5), 992–1009.

Matthew, T., Zhou, W., Rupprecht, J., Lim, L., Thomas-Hall, S. R., Doebbe, A., Kruse, O., Hankamer, B., Marx, U. C., Smith S. M. & Schenk, P. M. (2009). The metabolome of *Chlamydomonas reinhardtii* following induction of anaerobic H₂ production by sulfur depletion. *Journal of Biological Chemistry*, **284** (35), 23415–23425.

Maxwell, K. & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of experimental botany*, **51**(345), 659–668.

Míguez, L., Esperanza, M., Seoane, M. & Cid, Á. (2021). Assessment of cytotoxicity biomarkers on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to emerging and priority pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **208**, 1–9.

Mofeed, J. & Mosleh, Y.Y. (2013). Toxic responses and antioxidative enzymes activity of *Scenedesmus obliquus* exposed to fenhexamid and atrazine: alone and in mixture. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **95**, 234–240.

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. *Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology*, **6**, 373–380.

Ormerod, M.G. (2000) Flow cytometry: A practical approach. 3rd edition. Oxford University Press, Oxford, UK.

Pereira, B.M.P. & Tagkopoulos, I. (2019). Benzalkonium Chlorides: Uses, Regulatory Status, and Microbial Resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, **85**, 1–13.

Pérez, P., Fernández, E. & Beiras, R. (2009). Toxicity of Benzalkonium Chloride on Monoalgal Cultures and Natural Assemblages of Marine Phytoplankton. *Water Air Soil Pollut*, **201**, 319–330.

Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Abalde, J. & Cid, A. (2009). Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat. *Environment international*, **35**(2), 240–247.

Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C. & Cid, Á. (2012a). Screening acute cytotoxicity biomarkers using a microalga as test organism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **86**, 219–226.

Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Suárez-Bregua, P. & Cid, Á. (2012b). Flow cytometric analysis to evaluate physiological alterations in herbicide-exposed *Chlamydomonas moewusii* cells. *Ecotoxicology*, **21**, 409–420.

Samson, G. & Papovic, R., (1988). Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **16**, 272–278.

Sánchez-Fortún, S., Marvá, F., D'ors, A. & Costas, E. (2008). Inhibition of growth and photosynthesis of selected green microalgae as tools to evaluate toxicity of dodecylethyldimethyl-ammonium bromide. *Ecotoxicology*, **17** (4), 229–34.

Santaefemia Sánchez, S. (2019). Aplicación de técnicas de biorremediación para la eliminación de contaminantes mediante el uso de biomasa microalgal. Tesis doctoral. Universidade da Coruña.

Seoane Méndez, M. (2018). Efecto tóxico de microcontaminantes acuáticos emergentes sobre microalgas marinas mediante el análisis de biomarcadores de citotoxicidad. Tesis doctoral. Universidade da Coruña.

Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C. & Cid, Á. (2014). Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. *Marine Environmental Research*, **101**, 1–7.

Seoane, M., Esperanza, M., Rioboo, C., Herrero, C. & Cid, Á. (2017). Flow cytometric assay to assess short-term effects of personal care products on the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Chemosphere*, **171**, 339–347.

Singh, D.P. & Singh, S.P., (1987). Action of heavy metals on Hill activity and O₂ evolution in *Anacystis nidulans*. *Plant Physiology*, **83**, 12–14.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, **175**, 184–191.

Soares, N., Moreira, F., Santos, P., Venquiaruti, A.L. & Marques, M. (2020). Can short-term exposure to copper and atrazine be cytotoxic to microalgae? *Environmental Science and Pollution Research*, **27**, 27961–27970.

Solovchenko, A. E. (2012). Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. *Russian journal of plant physiology*, **59** (2), 167–176.

Soto, P., Gaete, H. & Hidalgo, M.E. (2011). Assessment of catalase activity, lipid peroxidation, chlorophyll-*a*, and growth rate in the freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to copper and zinc. *Latin American Journal of Aquatic Research*, **39** (2), 280–285.

Stauber, J. L. & Davies, C. M. (2000). Use and limitations of microbial bioassays for assessing copper bioavailability in the aquatic environment. *Environmental Reviews*, **8** (4), 255–301.

Torres, E. Cid, Á, Fidalgo, P., Herrero, C. & Abalde, J. (1995). Tolerance and detoxification mechanisms in marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* exposed to cadmium. *Journal of Marine Biotechnology*, **3**, 176–178.

Urzica, E. I., Vieler, A., Hong-Hermesdorf, A., Page, M. D., Casero, D., Gallaher, S. D., Kropat, J., Pellegrini, M., Benning, C. & Merchant, S. S. (2013). Remodeling of membrane lipids in iron-starved *Chlamydomonas*. *Journal of Biological Chemistry*, **288** (42), 30246–30258.

Xiang, R., Shi, J., Yu, Y., Zhang, H. & Dong, C. (2018). The effect of bisphenol A on growth, morphology, lipid peroxidation, antioxidant enzyme activity, and PS II in *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Scenedesmus quadricauda*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **74**, 515–526.

Zienkiewicz, K., Du, Z. Y., Ma, W., Vollheyde, K. & Benning, C. (2016). Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae—molecular, cellular and physiological insights. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1861** (9), 1269–1281.

1 – consultado en “https://www.nsf.gov/news/news_images.jsp?cntn_id=119439” (1/06/2021)