UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Ensayos de toxicidad de zinc sobre la diatomea bentónica *Halamphora luciae* (Amphipleuraceae, Ochrophyta).

Tesis presentada para optar por el título de **Licenciada en Ciencias Biológicas** de la Universidad de Buenos Aires

Julieta Silvina Antoni

Directora de Tesis: Dra. María Cecilia Rodríguez

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Laboratorio de Biología Comparada de Protistas

Departamento de Química Orgánica, CHIDECAR (CONICET)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Febrero, 2017

Ensayos de toxicidad de zinc sobre la diatomea bentónica *Halamphora luciae* (Amphipleuraceae, Ochrophyta)

Resumen

Se evaluó el efecto del zinc en cultivos axénicos de la diatomea bentónica *Halamphora luciae* aislada a partir de los sedimentos superficiales del estuario de Bahía Blanca. Las hipótesis que se pusieron a prueba fueron: a) la exposición al zinc produce una alteración en la tasa de crecimiento y composición de pigmentos fotosintéticos, b) la exposición al metal desencadena un estado de estrés oxidativo que provoca daño en los lípidos, aumento de compuestos fenólicos y aumento de la actividad superóxido dismutasa, c)en presencia del metal aumenta la movilidad celular conjuntamente con la producción de mucílago extracelular, d) las células crecidas en presencia de zinc exhiben cambios en la morfología y tamaño de los frústulos. Todos los bioensayos se hicieron por cuadruplicado en cristalizadores inoculados con 200 x 10^3 células e incubados a 12°C y con un fotoperíodo 12:12. Se seleccionaron dos puntos finales para los bioensayos (4 y 9 días, fase aguda y crónica, respectivamente).Se aplicó un ANOVA de dos factores (tratamiento y tiempo), considerando significativas las diferencias para $p<0,05$. Para determinar la CI50, se hicieron cultivos por triplicado en medio marino f/2 adicionados con dosis crecientes del metal y se determinó un valor de 50 µM. La exposición a la CI50 no modificó la tasa de crecimiento exponencial pero redujo a la mitad la densidad final de células. Tanto la cantidad de hidratos de carbono solubles en el medio de cultivo como la relación entre la concentración de clorofila *a* y de los pigmentos antena no varió luego de la exposición al zinc en ambos puntos finales. La etapa aguda se caracterizó por un aumento en el porcentaje de células en movimiento, una mayor producción de mucílago y la duplicación de la actividad superóxido dismutasa. Hacia la fase crónica solo se detectó un aumento significativo en la velocidad de desplazamiento de las células tratadas con zinc. En ambos tiempos, no se registró un incremento en los compuestos fenólicos ni en la peroxidación de lípidos. El análisis de sustancias poliméricas extracelulares solubles mostró una mayor heterogeneidad en los productos aislados de los cultivos con metal pero en ambos casos la glucosa fue el monosacárido mayoritario. La morfología del frústulo no presentó teratologías, pero disminuyó la relación superficie/volumen y el tamaño de las areolas en las células expuestas al metal. De los resultados observados se concluye que la biomasa celular, la movilidad, la relación superficie/volumen de las células, el tamaño de las areolas y la cuantificación de la actividad superóxido dismutasa resultan buenos indicadores de la toxicidad del zinc en bioensayos incubados durante 96 horas para la diatomea *Halamphora luciae.*

1. Introducción

Las diatomeas. Características generales

Las diatomeas comprenden aproximadamente entre 20000 a 500000 especies, incluidas en el Phylum Bacillariophyta, clase Bacillariophyceae dentro del supergrupo de eucariotas denominado SAR (Stramenophiles, Alveolates y Rhizaria) (Adl *et al*. 2012). Actualmente coexisten varios sistemas de clasificación por debajo del rango de Phylum. Ni los sistemas tradicionales basados en aspectos morfológicos, morfométricos y reproductivos ni los más recientes basados en filogenia molecular han permitido hasta el momento separar grupos totalmente naturales (Fig. 1) (Theriot *et al*. 2010; Medlin 2017, entre otros).

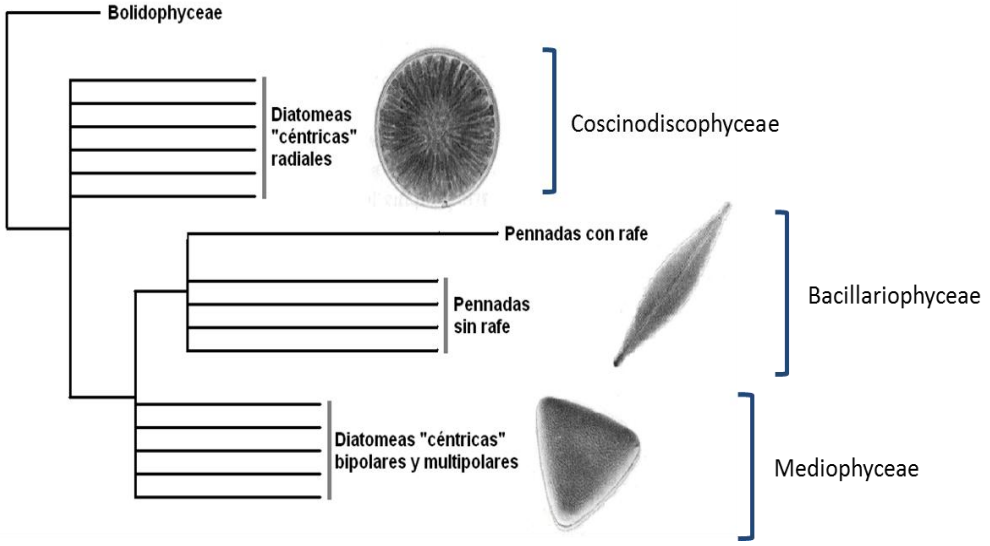

Figura 1. Esquema filogenético reciente para las diatomeas. Se evidencia que las relaciones entre los grupos aún no se han resuelto en su totalidad (Graham *et al.* 2010).

De distribución cosmopolita, se las encuentra desde los polos hasta el Ecuador, siendo integrantes frecuentes de las comunidades acuáticas (Graham *et al.* 2010). Estas microalgas juegan un papel decisivo en los ecosistemas acuáticos desde su aparición hace 190 a 250 millones de años, como uno de los principales productores de biomasa en los océanos y de oxígeno en el planeta (Bozarth *et al*. 2009). A escala global, son responsables de la fijación aproximada de un 40% decarbono fotosintético en los ambientes acuáticos marinos y continentales (Treguer *et al.* 1995; Falkowski *et al.* 1998), lo que las convierte en el grupo de organismos dominantes en la captación de CO_2 de la atmósfera. Además, tienen un papel crucial en los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno, fósforo y sílice (Sarthou *et al.* 2005).

Mayormente poseen hábito cocoide solitario aunque pueden formar agregados pseudofilamentosos, tubulares, laminares o estrellados. El tamaño de sus células varía de 2 a 4000 µm. Hay formas de vida libres o sésiles.

Poseen cloroplastos como producto de un proceso de endosimbiosis secundaria, están rodeados por cuatro membranas y los tilacoides se agrupan de a tres. Además de clorofila *a*, en las antenas de los fotosistemas aparecen clorofilas *c*2 y *c*1 o *c*3 y β-caroteno y xantofilas como diatoxantina, diadinoxantina y fucoxantina, que les confieren el color marrón-dorado característico. El pirenoide, de existir, es de posición central en cada plasto. El polisacárido de reserva es la crisolaminarina, un β-1, 3-glucano con diferentes grados de ramificación (Størseth *et al.* 2006), que se acumula dentro de vesículas extraplastidiales (Granum y Myklestad 2001). Adicionalmente, pueden acumular fosfolípidos, glicolipidos, ácidos grasos poli-insaturados y el polifosfato volutina.

La característica distintiva de este grupo es su cubierta celular, el frústulo, compuesto fundamentalmente por sílice amorfa u opalina recubierta de materia orgánica (Graham *et al.* 2010). El frústulo consta de dos piezas parcialmente superpuestas, la epiteca y la hipoteca, siendo la última generalmente de menor tamaño. Cada una de ellas está formada por una valva (epivalva e hipovalva respectivamente) y un cíngulo, que se compone generalmente de bandas de sílice formando epi- y el hipocíngulo (Fig. 2).

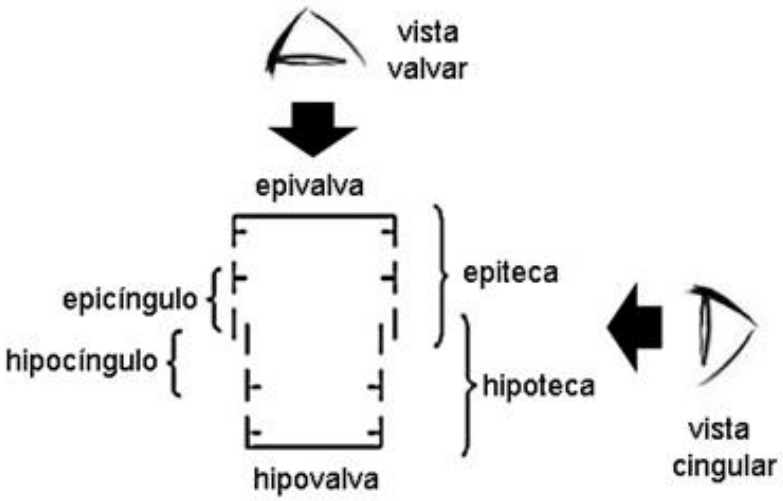

Figura 2. Representación del frústulo en vista cingular (Hasle y Sylverts en 1997)

El frústulo de las diatomeas se encuentra perforado por pequeños poros (poroides, areolas, alvéolos, etc.) que suelen disponerse regularmente en hileras denominadas estrías. Estas perforaciones actuarían alivianando la cubierta celular y son la superficie de contacto de la célula con el medio.

En base al tipo de simetría del frústulo en vista valvar (Figs. 1 y2), las diatomeas se agrupan en dos grandes grupos: céntricas, con simetría radial y pennadas, con simetría bilateral.

Algunas diatomeas pennadas poseen una hendidura longitudinal, el rafe, en una o en ambas valvas. La secreción de mucílago a lo largo del rafe o en campos de poros apicales en las diatomeas sin rafe está acoplada a la posibilidad de deslizamiento sobre superficies sólidas (Molino y Wetherbee 2008). Este movimiento responde a estímulos ambientales como la luz (Cohn *et al.* 2004; Mitbavkar y Anil 2004; McLachlan *et al.*2009; Ezequiel *et al.* 2015), la temperatura (Cohn *et al.* 2003), las mareas (Smith y Underwood 1998; Cohn *et al.* 2004; Mitbavkar y Anil 2004), los nutrientes (Cooksey y Cooksey 1988; Saburova y Polikarpov 2003; Witkowski *et al.* 2012; Daglio *et al.* 2016), la salinidad (Abdullahi *et al.* 2006; Apoya-Horton *et al.* 2006) o la presencia de compuestos tóxicos (Coquillé *et al.* 2015).

Aplicaciones

En los cuerpos acuáticos, los frústulos tienen una elevada tasa de hundimiento[1] (Falkowski *et al.* 2004). Al sedimentar, contribuyen a la captura de C-orgánico y al descenso del CO_2 atmosférico (Katz *et al.* 2005). Esta acumulación sedimentaria o diatomita, conocida comercialmente como tierra de diatomeas, se utiliza, entre otras aplicaciones, como filtrante en procesos industriales.

Recientemente, las diatomeas han recibido mayor atención debido al enorme potencial económico para la obtención de productos de alto valor agregado, como ácidos grasos poli-insaturados, en especial omega 3 (Popovich *et al.* 2012; Barnech-Bielsa *et al.* 2016) y triglicéridos (TAGs), materia prima para la producción de biocombustible por transesterificación (Hu *et al.* 2008; Bozarth *et al.* 2009).

El alto grado de preservación de los frústulos en los sedimentos a través de las eras geológicas

[1]cuando la densidad de las células excede la de la columna de agua esta se hunde con una velocidad o tasa que dependerá entre otros factores de la forma de la célula, movimiento turbulento del agua, etc.

las convierte en excelentes paleobioindicadores (*bioproxies*) para la reconstrucción de condiciones ambientales pasadas (Lotter *et al.* 1999; Rühland *et al.* 2003;Odfield 2005; Briner *et al.* 2006;Serra *et al.* 2016).Análogamente, debido a su rápida respuesta a los cambios ambientales, las comunidades de diatomeas bentónicas se emplean en programas de biomonitoreo de calidad de agua. Se han desarrollado varios índices basados en la evolución de la estructura de la comunidad de diatomeas, entre los que se puede mencionar el índice de Diatomeas Pampeanas, desarrollado por Gómez y Licursi (2001) para lagunas de la provincia de Buenos Aires.

Halamphora luciae (Cholnoky) Levkov comb. nov.

Halamphora luciae (Cholnoky) Levkov es una diatomea bentónica cosmopolita, que prolifera en ambientes salobres o marinos. Sus valvas son semi-lanceoladas, dorsiventrales con el margen dorsal arqueado suavemente y el margen ventral recto a levemente cóncavo. Los extremos de la valva son prolongados, capitados y ligeramente curvados en sentido ventral. El largo de la valva se encuentra en un rango de 17 a 43 µm y el ancho varía entre 3,5 a 6,5 µm. Las terminaciones del rafe son ligeramente arqueadas en la región proximal hacia la cara dorsal. Las estrías dorsales (17 a 21 en 10 µm) son paralelas en la zona central, adoptando una orientación radial hacia los extremos de la valva. Las estrías dorsales son uniseriadas, compuestas de areolas redondas a alargadas. Las estrías ventrales no están interrumpidas en la región del nódulo central, cada una comprende una sola areola alargada.

La valva interna presenta una única hilera de areolas próximas al rafe y separadas del resto de las areolas por una costilla longitudinal. La terminación distal del rafe se desvía hacia la parte ventral y termina con una helictoglosa débilmente desarrollada. En la zona proximal, el rafe finaliza con las helictoglosas fusionadas. Las estrías ventrales son uniseriadas, compuestas de areolas alargadas.

Utilización de diatomeas en bioensayos de toxicidad de metales pesados en laboratorio

Un bioensayo es un procedimiento que utiliza organismos y sus respuestas para estimar los efectos de agentes físicos y químicos en el ambiente (Graham *et al.* 2010). La utilización de microalgas en cultivos de laboratorio permite la realización de bioensayos de corta duración y bajo costo (Girling *et al.* 2000; Franklin *et al*. 2002). Los cultivos de microalgas se usan para verificar la correlación entre la respuesta específica y el factor de estrés, al permitir la variación

de parámetros ambientales como el pH, el contenido de nutrientes, el fotoperíodo, la temperatura, etc. De allí que varias organizaciones internacionales como la EPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos) o la Agencia Europea recomienden el empleo de microalgas en bioensayos rutinarios de laboratorio para el diagnóstico y predicción de daño ambiental (Batzias y Siontorou 2008, Rodríguez *et al.* 2008).

Dada su facilidad de cultivo, su abundancia y ubicuidad en cuerpos acuáticos y su rápida respuesta a cambios ambientales, las diatomeas reúnen las condiciones de un buen bioindicador en bioensayos (Bellinger y Sigee 2010).

En las microalgas, la respuesta a un factor de estrés ambiental como por ejemplo, un metal pesado, puede ser inmediata provocando cambios biomoleculares, bioquímicos y fisiológicos (Fig. 3) que en el término de días alteran las vías bioenergéticas y provocan modificaciones en la tasa de reproducción. Finalmente, esto se traducirá en variaciones en el crecimiento y/o la morfología (Rodríguez *et al.* 2008).

En los bioensayos estándar de toxicidad de metales pesados utilizando microalgas suelen medirse la disminución de la tasa de crecimiento (o de la tasa de división celular) y el rendimiento final de biomasa (o rendimiento celular) luego de diferentes tiempos fijos de exposición (Franklin *et al.* 2002). En general, estos ensayos se extienden por 96 h y son de exposición estática. La respuesta de la población se mide a través de cambios en la densidad celular con respecto al control.

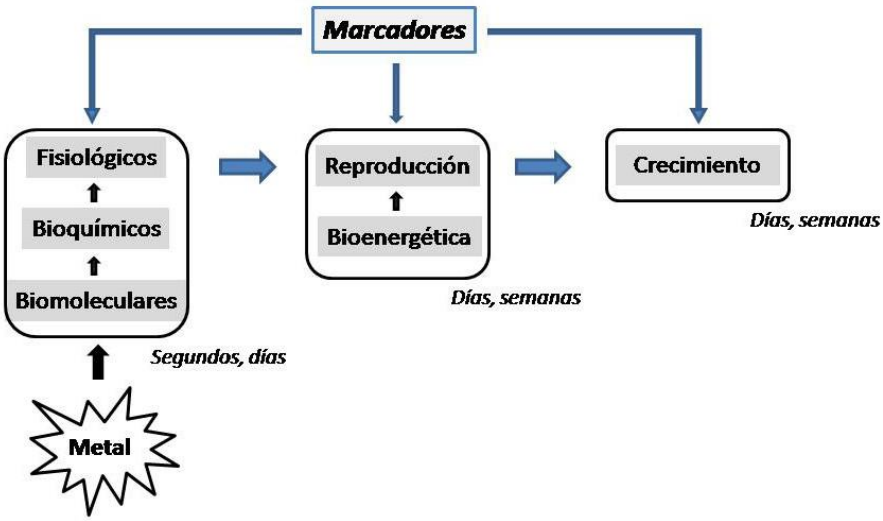

Figura 3. Diferentes marcadores según el punto final en bioensayos con microalgas (Adaptada a partir de Bellinger y Sigee 2010)

La realización de los ensayos se realiza en las primeras etapas del crecimiento exponencial a fin de contar con una biomasa lo suficientemente baja como para evitar problemas de variación de pH, limitaciones de luz y dióxido de carbono que puedan afectar los resultados (Franklin *et al.* 2002).

Uno de los parámetros utilizados para evaluar el efecto de un metal pesado sobre el crecimiento es la tasa de crecimiento, calculada a partir de la ecuación (Wood *et al.* 2005):

$$r = \frac{\ln(Nt) - \ln(Ni)}{\Delta t}$$

donde *r* es la tasa de crecimiento, *Nt* es el número de células en un determinado tiempo, *Ni* es el número de células iniciales y *Δt* es el intervalo de tiempo.

Otra forma de evaluar los resultados es calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento algal de las poblaciones expuestas a las distintas concentraciones del metal con respecto al control mediante la fórmula (Monteiro *et al.* 2010):

$$\%I = \frac{T - C}{C} x\ 100$$

donde *T* es el número de células del tratamiento para las distintas concentraciones del metal, *C* es el número de células para el control.

La concentración inhibitoria 50 (CI50) es la concentración estimada del metal que causa la reducción de un 50% de un parámetro como el crecimiento de la población expuesta en un determinado período de tiempo. Para su determinación pueden utilizarse métodos gráficos o el método probit o similares (Bliss *et al.* 1934).

El zinc: micronutriente esencial y metal pesado con efectos tóxicos en las diatomeas

El zinc es un micronutriente esencial (Morel *et al.* 1991, 1994). Al igual que otros nutrientes, debe estar presente en un rango de concentración óptima a fin de permitir el adecuado funcionamiento celular y el crecimiento. Su tasa de incorporación y los niveles intracelulares responden a un refinado sistema homeostático (Blaby-Haas y Merchant 2012).

El zinc (como catión Zn^{2+}) interviene como componente estructural y funcional de numerosas enzimas como la anhidrasa carbónica (Cox *et al.* 2000; Morelli y Scarano 2004), la Cu/Zn superóxido dismutasa (Armbrust *et al.* 2004; Bowler *et al.* 2008) y la alcohol deshidrogenasa (Brembu *et al*. 2011), enproteínas del tipo dedo de Zn que actúan como factores de transcripción génica (Reichmann y Ratcliffe 2000; Rayko *et al*. 2010) o en la regulación de la

mitosis (Bertrand y Poirier 2005). Además se ha informado que su déficit limita la incorporación de sílice en las diatomeas (De la Rocha *et al.* 2000).

Sin embargo, cuando el metal se encuentra en concentraciones superiores al optimo, se vuelve toxico. Ante esta situación adversa las células poseen diferentes mecanismos para mantener la integridad celular. Existe poca información sobre los mecanismos fisiológicos implicados en los efectos tóxicos a corto y largo plazo del zinc en diatomeas marinas (Souza Machado *et al.* 2014). Entre los efectos informados, se pueden enumerar la reducción de la producción de biomasa (Masmoudi *et al.* 2013 y bibliografía allí citada), la variación de la composición de pigmentos fotosintéticos (Rijstenbil *et al.* 1994b; Gillan *et al.* 1983, Markina y Aizdaicher 2006), reducción de la eficiencia fotosintética (Nguyen-Deroche *et al.* 2012) y estimulación de actividad de enzimas detoxificantes como la superóxido dismutasa (Rijstenbil *et al.* 1994 a,b) o la ascorbato peroxidasa (Nguyen-Deroche *et al.* 2012).

La exposición a metales pesados suele desencadenar un estado de estrés oxidativo, que puede definirse como el incremento neto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que exceden la capacidad de detoxificación de las defensas celulares antioxidantes. Las respuestas ante un estado de estrés oxidativo incluyen la activación de enzimas antioxidantes, como por ejemplo la superóxido dismutasa y el aumento de metabolitos detoxificantes (ascorbato, carotenos, compuestos fenólicos, etc). Si el grado de estrés oxidativo excede la capacidad detoxificante celular se desencadena la oxidación de macromoléculas como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos.

La Figura 4 resume en forma general los efectos tóxicos más frecuentemente observados en las células de microalgas luego de la exposición a metales pesados y los posibles mecanismos de detoxificación. Estos incluyen secuestro por ligandos intracelulares (fitoquelatinas) o extracelulares (polímeros extracelulares(EPS), mucílagos y paredes), aumento en la acumulación o en la actividad de metabolitos y enzimas detoxificantes del estrés oxidativo o la expulsión activa del metal mediante bombas de membrana.

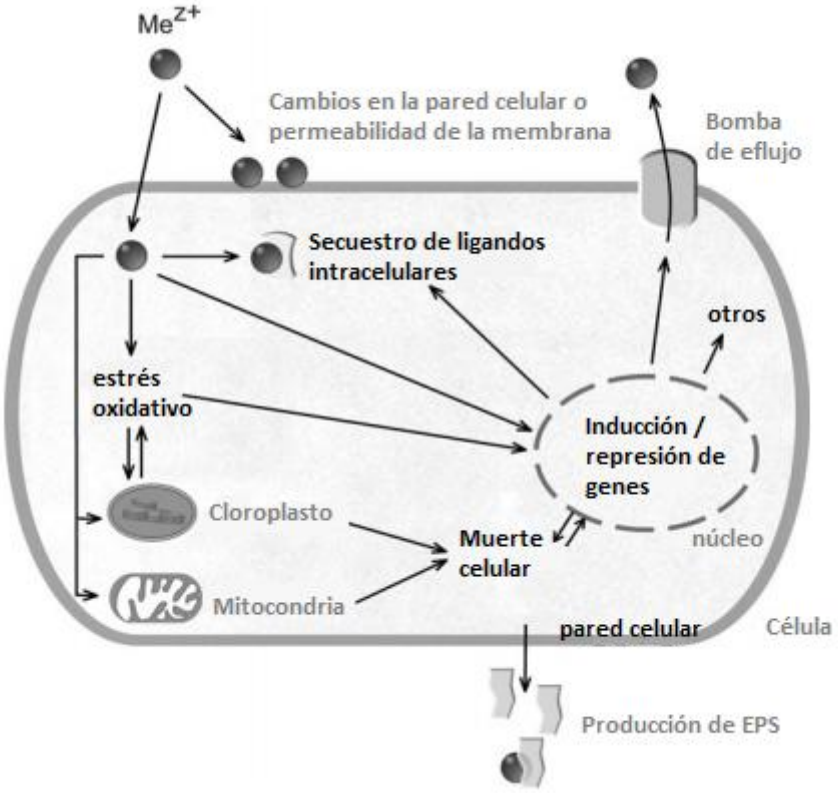

Figura 4. Toxicidad celular de metales pesados. La exposición a metales pesados puede alterar la permeabilidad de la membrana. Intracelularmente, al afectar el flujo de electrones en las vías bioenergéticas de mitocondrias y cloroplastos, desencadenan un estado de estrés oxidativo. El cambio del potencial REDOX celular modifica la expresión genética. Sobrepasados los mecanismos de control del estrés oxidativo, eventualmente ocurre la apoptosis y muerte celular. Mc= ion metálico (Adaptada de Morin *et al.* 2012).

2. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar la posible toxicidad del catión zinc en cultivos de *Halamphora luciae* aislada a partir de la planicie de marea del estuario de Bahía Blanca en bioensayos de laboratorio

Los objetivos específicos fueron:

- Verificar la presencia de cambios en la morfología y morfometría de los frústulos como consecuencia de la exposición al metal.
- Estudiar el efecto del zinc sobre la movilidad celular en los recipientes de cultivo mediante la obtención de microfilmaciones para la medición de la velocidad de desplazamiento de las células.
- Verificar la presencia de cambios en la composición de los fotosistemas como resultado de la exposición al metal por cuantificación espectrofotométrica de los pigmentos.
- Estudiar el efecto del zinc sobre la actividad superóxido dismutasa (SOD).

3. Hipótesis

Las hipótesis a poner a prueba en el presente trabajo son:

- Las células del cultivos de *H. luciae* expuestas al metal altera la tasa de crecimiento.
- La exposición al metal altera la composición de los fotosistemas en cultivos de *H. luciae*.
- En las células de *H. luciae* expuestas al metal se desencadena un estado de estrés oxidativo.
- La exposición al metal provoca cambios en la morfología y tamaño de los frústulos de *H. luciae* mucho más acentuados que los cambios morfotípicos normales de la especie.
- La exposición al metal desencadena un aumento en la movilidad celular en la células de *H. luciae*.
- En los cultivos expuestos al metal aumenta la producción de mucílago extracelular en *H. luciae*.
- La exposición al metal provoca el aumento de la actividad superóxido dismutasa en *H. luciae*.

4. Materiales y Métodos

4.1. *Origen de la cepa estudiada*

La cepa de *Halamphora luciae* (Cholnoky) Levkov comb. nov. utilizada en el presente trabajo fue aislada por la Lic. Yasmin Daglio a partir de una muestra de los sedimentos superficiales de la zona interna del estuario de Bahía Blanca (Buenos Aires, Argentina) en el año 2013.

4.2. *Cultivo y mantenimiento de la cepa*

La cepa se mantiene por repiques mensuales en medio marino f/2 (Andersen 2005) enriquecido con el agregado de macro y micronutrientes, incluyendo vitaminas, en las proporciones indicadas en la Tabla 1. El agua de mar artificial se preparó disolviendo 34,95 $g.l^{-1}$ de sal marina comercial (Instant Ocean, Aquarium Systems), con una salinidad final del 30‰ (corroborada por refractómetro manual). Los cultivos se llevaron a cabo en placas de pocillos o en cristalizadores conteniendo 5 o 40 ml de medio, respectivamente, según el protocolo experimental a utilizar.

La incubación se realizó en una cámara fría a 12°C y bajo una intensidad lumínica de 20 µmoles m^{-2} s^{-1}, con un régimen fotoperiódico de 12:12 horas de luz: oscuridad.

Tabla 1: Composición del medio de cultivo f/2 modificado.

Macronutrientes	**Concentración final (µM)**
$NaNO_3$	882
$NaH_2PO_4 . H_2O$	36,2
$NaSiO_3 . 9H_2O$	106
Micronutrientes	**Concentración final (µM)**
$FeCl_3 . H2O$	11,7
$Na_2EDTA . 2H2O$	11,7
$MnCl_2 . 4H2O$	0,91
$ZnSO_4 . 7H2O$	0,0765
$CoCl_2 . 6H2O$	0,042
$CuSO_4 . 5H2O$	0,0393
Na_2MoO_4	0,026
Vitaminas	**Concentración final (nM)**
Tiamina	296
Biotina	2,05
Cianocobalamina	0,369

pH del medio: 7,9-8,0

4.3. *Bioensayos*

4.3.1. *Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 (CI50)*

Las algas se cultivaron axénicamente (según lo indicado en 4.2) en medio salino f/2 adicionado con concentraciones nominales crecientes de $ZnSO_4$ (0-120 µM). La determinación de la CI50 (concentración del metal que reduce el crecimiento de la población algal a la mitad respecto del control sin agregado adicional de Zn) se llevó a cabo en placas de seis pocillos con tres réplicas, cuantificando el crecimiento como el aumento del número de células por área a lo largo del tiempo. Para ello se relevó fotográficamente el número de células en al menos ocho campos de 0,3 mm^2 al azar por pocillo al microscopio invertido (Fig. 5). Para el recuento de células sobre las microfotografías obtenidas a 1000 aumentos se utilizó el programa TS View.

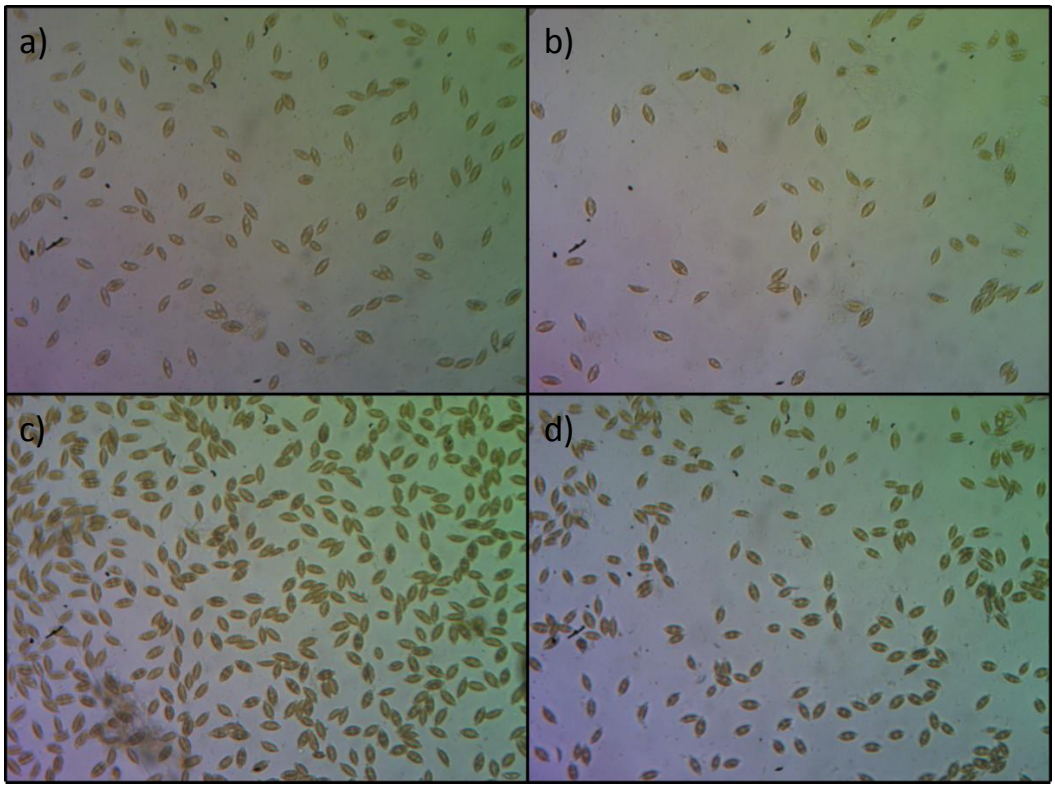

Figura 5. Microfotografías obtenidas con el programa TS View de H. luciae en cultivos en medio f/2 (a) y f/2 adicionado con zinc (b) cosechados el día 4, y en medio f/2 (c) y f/2 adicionado con zinc (d) cosechados el día 9.

Se compararon las tasas de crecimiento exponencial en presencia y ausencia del metal según Wood *et al.* (2005). Se determinó la CI50 con el programa PROALG2 (1989). Para los bioensayos subsiguientes se empleó únicamente la concentración de metal correspondiente a la CI50.

El protocolo experimental utilizado se resume en la Figura 6.

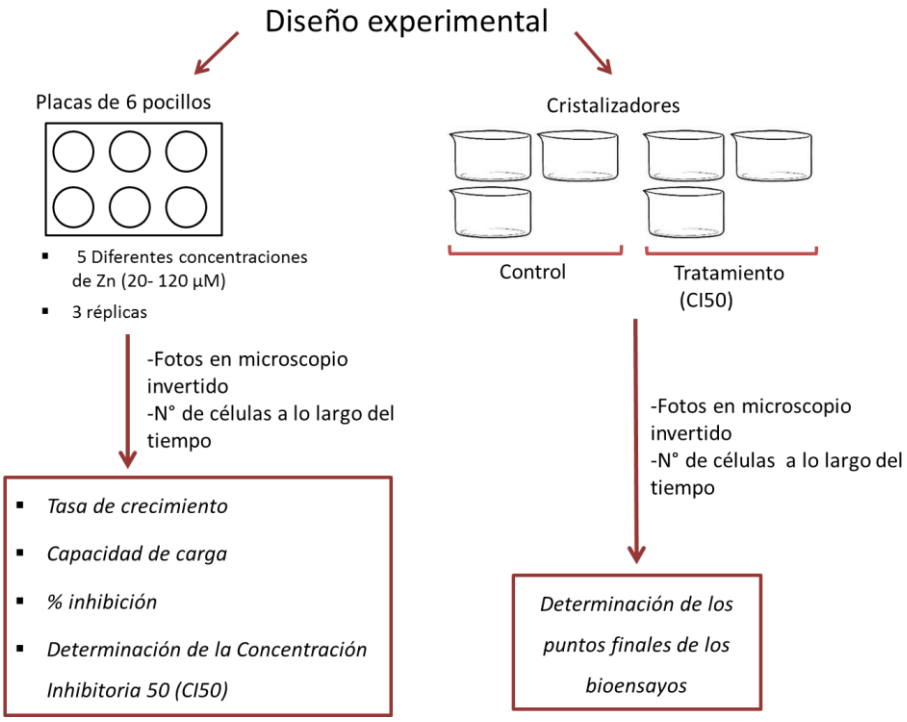

Figura 6. Diseño experimental de los bioensayos para la determinación de la tasa de crecimiento (r), la capacidad de carga (K), % de inhibición, la Concentración Inhibitoria 50 (CI50) y los puntos finales de los bioensayos subsiguientes.

4.3.2. *Determinación de los puntos finales de los bioensayos*

Para ello se inocularon 218.800 de células.ml^{-1} en cristalizadores de 100 ml (Fig. 6). Se obtuvieron las curvas de crecimiento en el medio f/2 (control) y para la concentración de Zn correspondiente a la CI50 (tratamiento). Se calcularon las tasas de crecimiento exponencial aplicando logaritmo natural del número de células. La pendiente de la recta obtenida se consideró la tasa de crecimiento exponencial. Se consideró la meseta de la curva logística como el valor de la capacidad de carga (K). Se determinaron dos puntos finales del bioensayo: fase exponencial (aguda, día 4) y fase estacionaria (de restauración, día 9) de exposición al metal. Todos los cultivos se realizaron por triplicado.

Los bioensayos posteriores se realizaron por cuadruplicado, iniciando los cultivos en las mismas condiciones descritas más arriba y efectuando la cosecha a los 4 y 9 días de iniciada la incubación (Fig. 7)

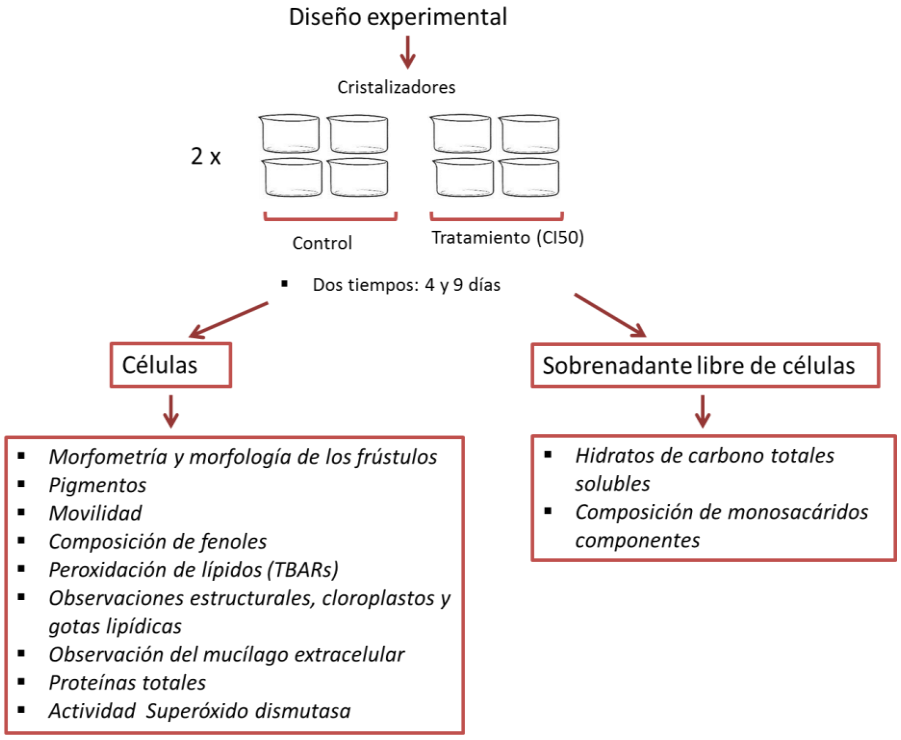

Figura 7. Diseño experimental de los bioensayos para la determinación de los diferentes parámetros medidos en función de las células y del sobrenadante.

4.3.3. *Bioensayos de movilidad*

Se realizaron filmaciones de 20 s de duración al microscopio invertido (Olympus CK40 equipado con una cámara de video Arcano 9.0). Se midió la velocidad ($\mu m.s^{-1}$) en al menos 10 células seleccionadas al azar determinando la distancia entre cada posición de inicio y final del desplazamiento con el programa AMCap (1997-2004). Se utilizó la misma duración total del tiempo de filmación para cada cristalizador a fin de minimizar los efectos de aumento de temperatura y de intensidad lumínica en la platina del microscopio. Al mismo tiempo, se determinó el porcentaje de células en movimiento por campo (área0,3 mm^2).

4.4. *Morfología y morfometría de los frústulos*

4.4.1. *Observación de las células al microscopio óptico*

Las células se examinaron bajo un microscopio Olympus bx50 equipado con DIC (Contraste por interferencia diferencial) y cámara fotográfica digital (Olympus c7070).

4.4.2. *Microscopía electrónica de barrido (MEB)*

Para la observación al MEB se procedió a la digestión de la materia orgánica de los frústulos (Battarbee 1986). Las células se cosecharon por centrifugación suave en tubos Falcon y se resuspendieron en 3ml de ácido sulfúrico concentrado durante 24 horas aproximadamente. Finalmente se descartó el ácido y se lavó repetidamente con agua destilada hasta neutralidad.

La suspensión resultante se secó directamente sobre una cinta de cobre que fue metalizada con platino. Las observaciones se efectuaron en un microscopio electrónico de barrido Gemini Zeiss DSM 982 del Centro de Microscopia Avanzadas (FCEN- UBA) utilizando un voltaje de aceleración de 15 kV.

Sobre las microfotografías obtenidas, se midieron rasgos morfológicos (forma de las valvas, contorno de las areolas, etc) y morfométricos (longitud de los ejes apical (a), pervalvar (b) y ancho de valva (c) (Fig. 8), cantidad de estrías en 10 µm y número de areolas en 1 µm) utilizando el programa ImageJ (NIH, National Institutes of Health, EEUU). Para la descripción de la morfología de las valvas se siguió la terminología de Levkov (2009).

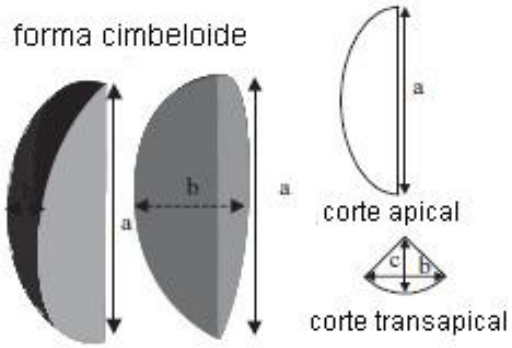

Figura 8. Valores morfométricos analizados en el trabajo, a= eje apical, b= eje pervalvar, c=eje transapical o transversal. De: Sun y Liu (2003).

Para el cálculo del biovolumen y área superficial se aplicaron las fórmulas de Sun y Liu (2003). Debido a su asimetría, los frústulos libres de materia orgánica casi siempre aparecen con el cíngulo ventral (más angosto) y ambos rafes hacia arriba. Para los cálculos morfométricos de la forma cimbeloide se midió el largo de los ejes apical y pervalvar. Se consideró el ancho de la valva equivalente al eje transapical (Fig. 8) (Daglio *et al.* 2016).

4.4.3. *Observación del mucílago al microscopio óptico*

Se colocaron cubreobjetos en el fondo de los cristalizadores. Luego de 4 y 9 días, se retiraron cuidadosamente con una pinza de punta fina y se tiñeron con una solución acuosa de azul de toluidina al 0,05 %, pH 4,5 (Higgins *et al.* 2003) para permitir la observación del mucílago extracelular adherido sobre la superficie del vidrio.

4.5. *Métodos Analíticos*

4.5.1. *Determinación de hidratos de carbonos totales* (Dubois *et al.* 1956).

A 0,5 ml de solución estándar conteniendo hasta 35 ug totales de azúcar, se le agregó 0,5 ml de solución de fenol al 5%. Luego se dejaron caer mediante dispensador 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado (98%), directamente sobre la superficie de la solución a fin de asegurar el máximo calentamiento. Se dejó enfriar durante aproximadamente 10 min a temperatura ambiente, y se leyó la absorbancia a 490 nm.

Los valores se refirieron a una curva de calibración de glucosa.

4.5.2. *Determinación de proteínas totales* (Lowry *et al.* 1951).

A 0,4 ml de solución estándar, conteniendo hasta 500 µg de proteínas por mililitro, se le agregaron 2ml de solución conteniendo 1 ml de sulfato cúprico pentahidratado al 0,5%, en solución de tartrato de sodio y potasio al 1% y 50 ml de carbonato de sodio al 2% en NaOH 0,1N. Se mezcló y dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos, al cabo de lo cual se agregaron, agitando exhaustivamente, 0,2 ml de reactivo de Folin Ciocalteau diluido al medio. Luego de 30 minutos se leyó la absorbancia a 500nm.

Los valores obtenidos se calcularon mediante el empleo de una curva de calibración de albúmina de suero bovino.

4.5.3. *Determinación de la composición de pigmentos fotosintéticos* (Strickland y Parsons 1972)

Las células cosechadas por centrifugación en tubos Eppendorf se resuspendieron en 1 ml de acetona al 80%. Se agitaron vigorosamente hasta observar un color verde homogéneo. Se recogió el extracto acetónico en un tubo de ensayo, repitiendo la extracción sobre el pellet celular hasta lograr su total decoloración. Los extractos acetónicos se mantuvieron en oscuridad hasta el momento de la lectura en el espectrofotómetro. Los sobrenadantes se reunieron y se normalizó el volumen a 5 ml. Se leyeron las absorbancias a 470, 630 y 664 nm a

fin de cuantificar los pigmentos fotosintéticos mediante las siguientes fórmulas (Sterman 1988):

- Clorofila A: 11,47 A_{664} – 0,4 A_{630}
- Clorofila C1 + C2: 24,36 A_{630} – 3,73 A_{664}
- Carotenos: (1000 A_{470} – 3,27 Chl*a* – 104 Chl*c*)/ 198

Los valores se expresaron como µg de pigmento.peso fresco^{-1} (PF) o como µg de pigmento.célula^{-1}. Para la determinación del peso fresco, se tomó la suspensión celular bien homogeneizada en tubos Eppendorf previamente tarados. Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se secó cuidadosamente con tiras finas de papel de filtro hasta eliminar el líquido residual. Se pesaron los tubos y la diferencia entre esta pesada y la tara se utilizó como valor de peso fresco.

4.5.4. *Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico* (TBARs) (Vavilin *et al.* 1998)

El malondialdehido (MDA), uno de los subproductos originados a partir de la peroxidación de lípidos, reacciona con el ácido tiobarbitúrico en caliente para dar un compuesto de color rosado que puede cuantificarse espectrofotométricamente a 532 nm.

Las soluciones se preparan en el día.

Solución A: solución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) al 4% conteniendo butilen hidroxitolueno (BHT) al 0,01% y ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,3%.

Solución B: Ídem al anterior pero sin el agregado de ácido tiobarbitúrico.

Para la determinación del MDA en los precipitados celulares se tomaron dos alícuotas de 1 ml de suspensión algal de cada cultivo, resuspendiéndolas en las soluciones A y B, respectivamente. Se agitó vigorosamente y se incubó a 95°C durante 30 minutos en baño agua hirviente. Al cabo de la incubación, se llevó a temperatura ambiente y se clarificó por centrifugación. Se midió la absorbancia a 440, 532 y 600 nm. En células vegetales, las lecturas de absorbancia a 440 y 600 nm permiten corregir la interferencia debida a pigmentos fotosintéticos y azúcares. La concentración de MDA se calculó utilizando la ecuación de Hodges *et al.* (1999):

$$\frac{MDA(nmol)}{ml} = \frac{(I - II)}{0{,}157\ fd}$$

Donde I es [(A532 sol **A**) – (A600 sol **A**] - [(A532 sol **B**) – (A600 sol **B**)], II es [(A440 sol **A**) – (A600 sol **A**)] 0,0571 y fd: factor de dilución calculado como volumen de muestra inicial/volumen de resuspensión en reactivo +/-TBA.

Los valores se expresaron como $nmol.PF^{-1}$

4.5.5. *Determinación de compuestos fenólicos* (Duval *et al.* 2000)

Se obtuvieron los homogenatos celulares por ultrasonicación (3 pulsos de 10 s a una frecuencia máxima de 20 KHz) a partir de células resuspendidas en 0,7 ml de buffer fosfato 0,2 M pH 7,6. El residuo celular se eliminó por centrifugación a 12000 rpm.

Se tomaron 50 y 150 µl de homogenato celular, a los cuales se adicionaron 2,5 ml de reactivo de Folin Ciocalteau (diluido 1:10) e inmediatamente después, 2 ml de la solución de Na_2CO_3 anhidro al 7.5 % (p/v). Se agitaron y se incubaron durante 15 min en un baño de agua a 45°C.

Se llevó a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 765 nm antes de los 30 min, refiriendo los valores a una curva estándar de ácido gálico.

El contenido de fenoles se expresó como µequivalentes de ácido gálico.PF^{-1}

4.6. *Medición de la actividad superóxido dismutasa* (SOD) (Beauchamp y Fridovich 1971)

4.6.1. *Obtención de los homogenatos celulares*

Las células se resuspendieron en buffer fosfato de sodio 0,2 M (pH 7,6) con el agregado de los inhibidores de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF (0,5 mM) y benzamidina (0,2 mM). Se sonicaron en baño de hielo mediante 5 pulsos de 15 segundos a una frecuencia máxima de 20 KHz, con un intervalo de 30 segundos entre cada pulso. El residuo celular se eliminó por centrifugación a 4°C durante 25 minutos a 10500 rpm.

4.6.2. *Medición de la actividad SOD*

La fotoreducción de la riboflavina en presencia de metionina genera anión superóxido que reduce el cloruro de nitro azul tetrazolio (NBT) a formazan, compuesto azul que puede cuantificarse por lectura a 550 nm (Fig. 9). En presencia de SOD, el radical superóxido dismuta en O_2 y H_2O_2 y disminuye la aparición de formazan. Se considera que 1 UE es aquella que produce un 50 % de inhibición de la reducción del NBT.

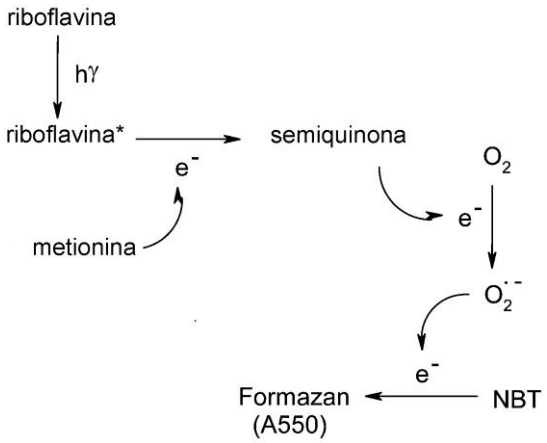

Figura 9. Ensayo de medición de la actividad SOD basado en la cuantificación de la inhibición de la fotoreducción del NBT

La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos. La mezcla de reacción consistió en alícuotas de 5,10, 15 y 20 µl de homogenato celular, 13 mM metionina, 0,1 mM EDTA, 75 µM cloruro de nitro azul de tetrazolio (NBT) y 2 µM riboflavina en buffer fosfato 0,2 M pH 7,8.

La placa se protegió de la luz con un paño negro hasta el inicio de la reacción en un sistema de iluminación por dos tubos fluorescentes (56,7-71,55 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) que se extendió durante 15 min. Al finalizar la incubación se protegió nuevamente de la luz hasta la lectura de absorbancia a 560 nm en FLUOstar OPTIMA BMG Labtech, equipado con un software de análisis de datos Mars.

Como controles de reducción máxima del colorante se omitió el agregado del homogenato celular a la mezcla de reacción, considerando el valor de absorbancia de los mismos como representativo del 100% de formación de azul de formazan.

Se graficó para cada muestra enzimática, el porcentaje de inhibición (tomando como 0% la absorbancia del control de reducción total) vs. Volumen de muestra enzimática.

Se calculó el volumen de muestra enzimática que contiene 1 unidad SOD, o sea el volumen al que se registra el 50 % de inhibición de la reducción del NBT. Los valores se expresaron como UE. mg $proteínas^{-1}$.

4.7. *Sustancias poliméricas extracelulares solubles en el medio de cultivo* (sEPS)

4.7.1. *Obtención*

Las sustancias poliméricas extracelulares solubles en el medio de cultivo (sEPS) se obtuvieron mediante la cosecha de cultivos de aproximadamente 30 días, en cristalizadores de 100 ml con medio f/2 con y sin Zn. La cosecha se realizó raspando las células que estaban adheridas en el fondo del recipiente. Se centrifugó para separar el sobrenadante. Los sobrenadantes libres de células se reunieron y se conservaron en heladera a 4°C.

Se concentraron 2 litros de sobrenadante de cultivos control y tratamiento en un evaporador rotatorio. Una vez reducido el volumen aproximadamente unas 200 veces, se precipitaron los polímeros extracelulares mediante el agregado de etanol (4:1) en frío durante una noche. El alcohol se eliminó en el evaporador rotatorio. La solución acuosa se concentró hasta llegar a un volumen final de 2 ml aproximadamente.

4.7.2. *Desalado por cromatografía de permeación en geles*

Las soluciones acuosas concentradas obtenidas en 4.7.1. Se sembraron en una columna (50 x 1,5 cm d.i.) de Bio-Gel P-2 (Bio-Rad), usando agua como solvente de elución. El volumen de exclusión (25-26 ml) se determinó con una solución de Blue Dextran2000 (Sigma) al 0.2%. Se recolectaron 1,5 ml por tubo en un colector de fracciones (BioRad, Modelo 2110). El perfil de elución se siguió midiendo los hidratos de carbono totales (Dubois *et al.* 1956) en cada uno de los tubos. Para la estimación del contenido de sales residuales se aplicó la precipitación de cloruros con nitrato de plata en placa de toque. Los tubos correspondientes a picos de hidratos de carbono se reunieron y liofilizaron.

4.7.3. *Hidrólisis ácida y obtención de los alditoles peracetilados (*Albersheim *et al. 1967)*

Las fracciones obtenidas de la columna de cromatografía de permeación en geles (10-13mg) se hidrolizaron en ácido trifluoroácético (TFA) 2N en viales con tapa de teflón, calentando en estufa a 120°C durante 90 minutos. Los productos hidrolizados se secaron bajo corriente de aire y agregado sucesivo de agua destilada hasta la eliminación total del ácido.

Las muestras hidrolizadas se resuspendieron en 0,5 ml de hidróxido de amonio 1 M y se redujeron durante una noche con borohidruro de sodio (aprox. 5 mg) a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reducción se eliminó el exceso del agente reductor con gotas de ácido acético glacial. El ácido bórico formado se eliminó como borato de metilo mediante cinco agregados sucesivos de 1 ml de metanol anhidro y llevando a seco entre cada agregado. Las

muestras se dejaron una noche en desecador al vacío y finalmente la mezcla de alditoles se acetiló con el agregado de anhídrido acético: piridina (1:1) a 100°C durante 45 minutos. Los alditoles peracetilados se extrajeron de la fase clorofórmica de una mezcla cloroformo: agua (2:1). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de bicarbonato de sodio y agua destilada y se secó con sulfato de sodio anhidro. Se llevó a sequedad. Para la inyección en el cromatógrafo las muestras se disolvieron en cloroformo.

4.7.4. *Cromatografía gas-líquido*

Los monosacáridos componentes de las muestras se identificaron luego de la hidrólisis ácida y derivatización a alditoles acetilados mediante cromatografía gas-líquido. Ésta se llevó a cabo en un cromatógrafo Hewlett Packard 5890A equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un integrador HP3395. Se utilizó nitrógeno como gas portador y las corridas se efectuaron con valores de flujo entre 0,8 y 1 ml.min^{-1} y una relación de split cercana a 80:1. Se utilizó una columna capilar SP-2380 (Supelco) de 80 metros de longitud, operando con una presión de gas carrier de 1-1,3 ml.min^{-1} y una presión de cabeza de columna de 15 psi. Las corridas se efectuaron en condiciones isotérmicas a 220°C. La temperatura del inyector y del detector fue de 240 °C. La asignación de las señales comparando los tiempos de retención de los picos de la muestra contra los de mezclas estándares de azúcares.

Para calcular el porcentaje de monosacáridos componentes se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje molar} = \frac{\frac{Ai}{PMi}}{\left(\frac{Ai}{PMi}\right)} \times 100$$

donde: Ai corresponde al área del pico de cada monosacárido en el cromatograma y PMi es el peso molecular del monosacárido correspondiente (como alditol acetilado).

4.8. *Análisis estadísticos de los resultados*

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Infostat 2014 (Di Rienzo *et al.* 2014). En todas la pruebas estadísticas, las diferencias se consideraron significativas cuando $p<0,05$.

5. Resultados

5.1. *Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 (CI50)*

La curva de crecimiento logística de *Halamphora luciae* mostró las fases de aclimatación, exponencial y estacionaria, tanto para los cultivos en medio f/2 (control) como para los que contenían dosis crecientes de zinc (Fig. 10, Tabla 2). Es importante señalar que durante el recuento al microscopio invertido no se observó superposición de células hasta el día 10 lo que permitió una mayor precisión en el recuento por unidad de superficie.

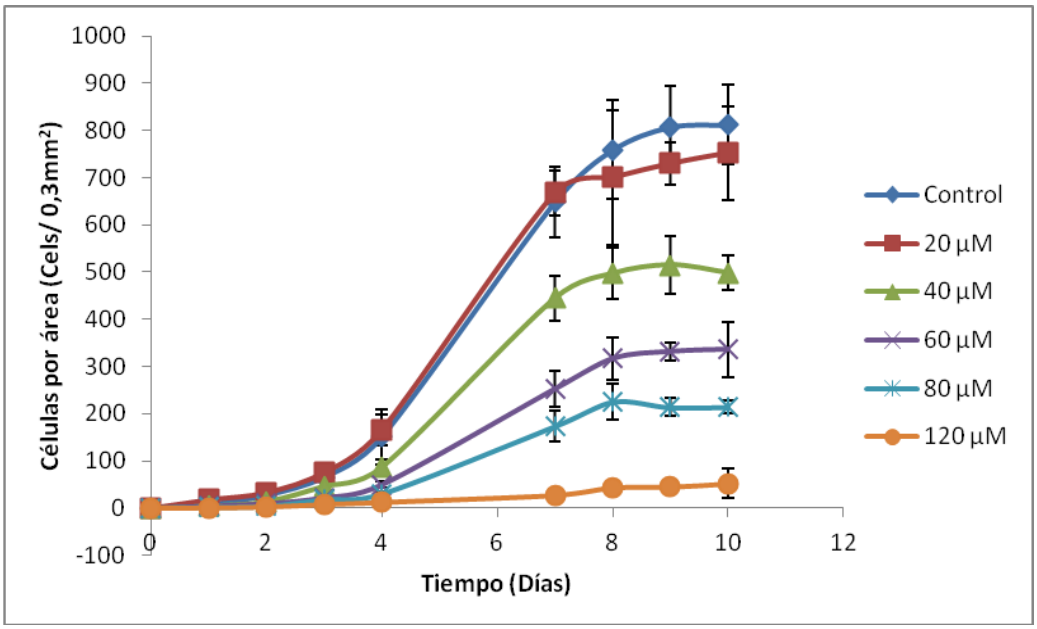

Figura 10. Crecimiento de *Halamphora luciae* en medio f/2 (control) y tratamientos con concentraciones crecientes de zinc en placa de pocillos. Los resultados corresponden a la media ± DE para n=3.

La estimación de la Concentración Inhibitoria 50 (CI50) mediante el programa PROALG2 resultó de 49 ± 4 µM (día 9).

Únicamente los cultivos en presencia de la mayor concentración de Zinc (120 µM Zn) exhibieron una reducción significativa ($p<0,05$) de la tasa de crecimiento exponencial respecto del control (Fig. 11, Tabla 2). En cambio, con la excepción del tratamiento con 20 µM Zn, la capacidad de carga de los cultivos en presencia del metal se redujo significativamente ($p<0,05$) respecto del control (Tabla 2).

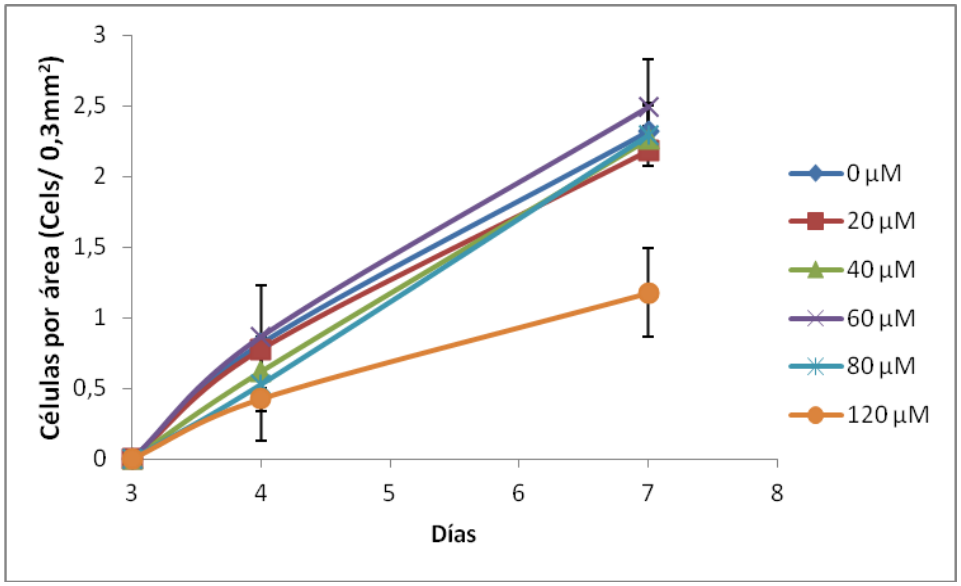

Figura 11. Representación logarítmica de las curvas de crecimiento de *Halamphora luciae* en medio f/2 (control) y tratamientos con concentraciones crecientes de zinc en placa de pocillos. Los valores corresponden a la media ± DE para n=3. Nótese que únicamente la pendiente del tratamiento con 120 µM Zn difiere de las restantes.

Tabla 2. Valores de la tasa de crecimiento (r), la capacidad de carga (K) y del porcentaje de inhibición respecto de los controles a los 4 ($I_{4\ días}$) y 9($I_{9\ días}$) días para el cultivo control (f/2) y los cultivos en f/2 con concentraciones crecientes del metal (20-120 µM Zn). Los valorescorresponden a la media ± EE para n=3 . Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (p<0,05)respecto del control.

Zn agregado (µM)	r ($cel.ml^{-1}.dia^{-1}$)	$K_{9\ días}$ ($cel.ml^{-1}$)	$I_{4\ días}$ (%)	$I_{9\ días}$ (%)
Control	0,50 ± 0,04	242,3 ± 14,8	0	0
20	0,45 ± 0,03	219,1 ± 7,6	0	7,9 ± 5,1*
40	0,49 ± 0,03	154,5 ± 10,5*	34,6 ± 12,9*	35,1 ± 7,7*
60	0,54 ± 0,04	99,6 ± 3,4*	62,5 ± 4,69*	58,1 ± 2,5*
80	0,53 ± 0,04	64,1 ± 3,3*	77,4 ± 4,8*	73 ± 2*
120	0,36 ± 0,07*	13,4 ± 1,6*	90,7 ± 3,4*	94,4 ± 1,2*

5.2. *Determinación de los puntos finales de los bioensayos*

Para establecer los puntos finales de los bioensayos se llevó a cabo un aumento de volumen de los cultivos en cristalizadores de 100 ml conteniendo 40 ml de medio de cultivo. Empleando como tratamiento de CI50 estimada en el punto 5.1 y partiendo de un número inicial de células de 200.000 - 230.000 células.ml^{-1}, se seleccionaron los días 4 (fase exponencial) y 9 (fase estacionaria) como puntos finales del bioensayo (Fig. 12).

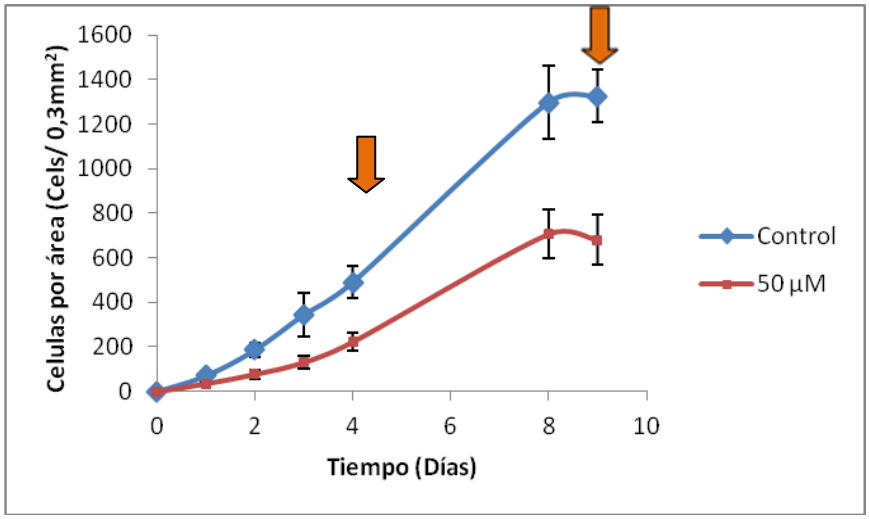

Figura 12. Crecimiento de *Halamphora luciae* en medio f/2 (control) y tratamientos (f/2 + 50 µM Zn) en cristalizadores de 100 ml. Los resultados corresponden a la media ± DE para n=4. Las flechas indican los puntos finales seleccionados (días 4 y 9).

5.3. M*orfología y morfometría de los frústulos*

5.3.1. *Observación de las células al microscopio óptico*

Se observó la morfología y coloración de los cloroplastos en las células *in vivo*. En el día 4, para ambos tratamientos, se observó una coloración similar y la forma en H del cloroplasto, característica de la especie. En ambos casos solo se encontraron pequeñas, casi indistinguibles, gotas de lípidos (Fig. 13 a y d).

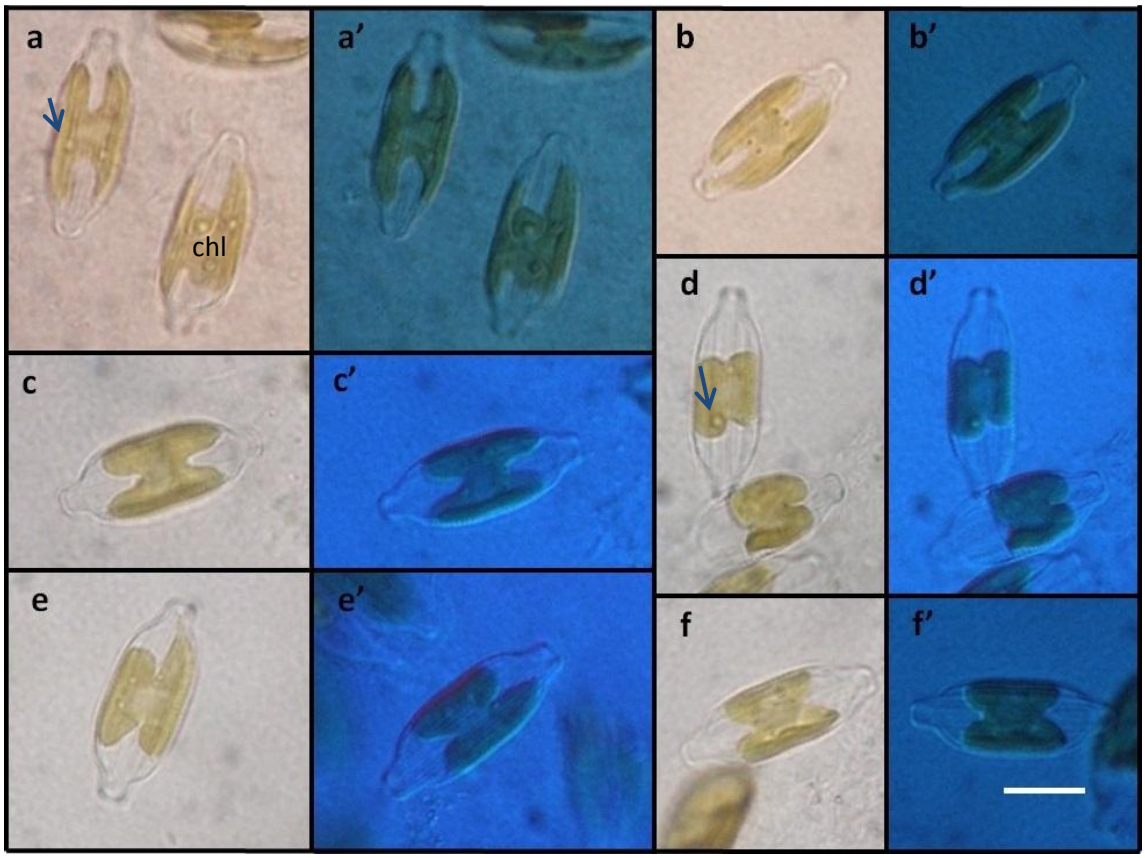

Figura 13. Vista general de células de *H. luciae* en cultivos en medio f/2 (a-c) y f/2 adicionado con zinc (d-f) cosechados el día 4.Referencias: (') DIC (contraste por interferencia diferencial), chl, cloroplasto, flecha, cuerpos de lípidos. Escala: 10 µm.

En el día 9, las células de los tratamientos exhibieron gotas de lípidos de mayor tamaño comparadas con las del control. En general, aparecían ubicadas a cada extremo de las células (Fig. 14 b y e). En cuanto a los cloroplastos no se observaron diferencias ni en su morfología, posición ni en su coloración.

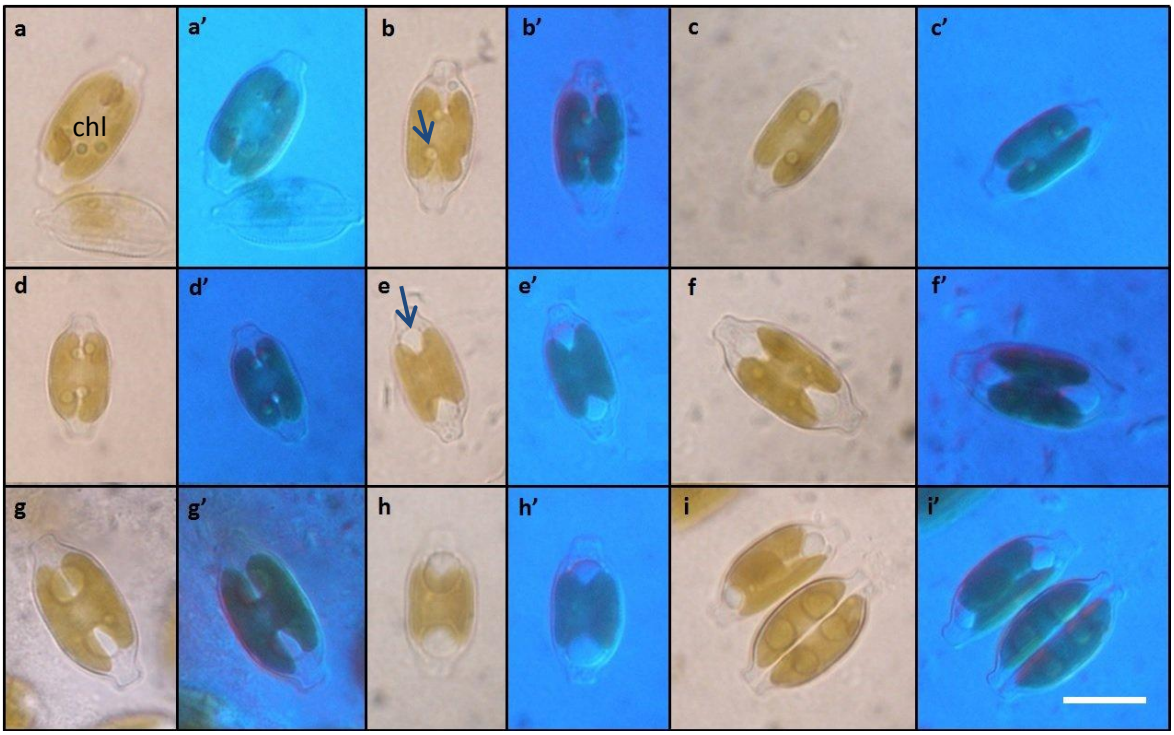

Figura 14. Vista general de células de *H. luciae* en cultivos en medio f/2 (a-d) y f/2 adicionado con zinc (e-i) cosechados el día 9. Referencias: (') DIC (contraste por interferencia diferencial), chl, cloroplasto, flecha, cuerpos de lípidos. Escala: 10 µm.

5.3.2. *Características ultraestructurales de los frústulos*

En el cultivo control, las células de *Halamphora luciae* exhibieron valvas semilanceoladas con extremos capitados y márgenes ventrales rectos o muy levemente curvados en sentido ventral. El largo de valva osciló entre 23 y 28 µm mientras que el ancho fue de 5 a 6 µm. Al MEB, en vista valvar externa, las valvas mostraron simetría dorsiventral con los márgenes dorsales suavemente arqueados y los ventrales rectos (Fig.15, 16). El rafe, levemente curvado exhibió los extremos proximales expandidos y curvados dorsalmente (Fig. 15 a, b, e y Fig. 16 a, b, e). Las estrías dorsales uniseriadas estaban compuestas de areolas redondeadas a levemente elongadas (Fig. 15 y 16 a, b). En vista valvar interna, se observó una única hilera de areolas cercanas al rafe limitada por una costilla longitudinal (Fig. 17 vista interna).

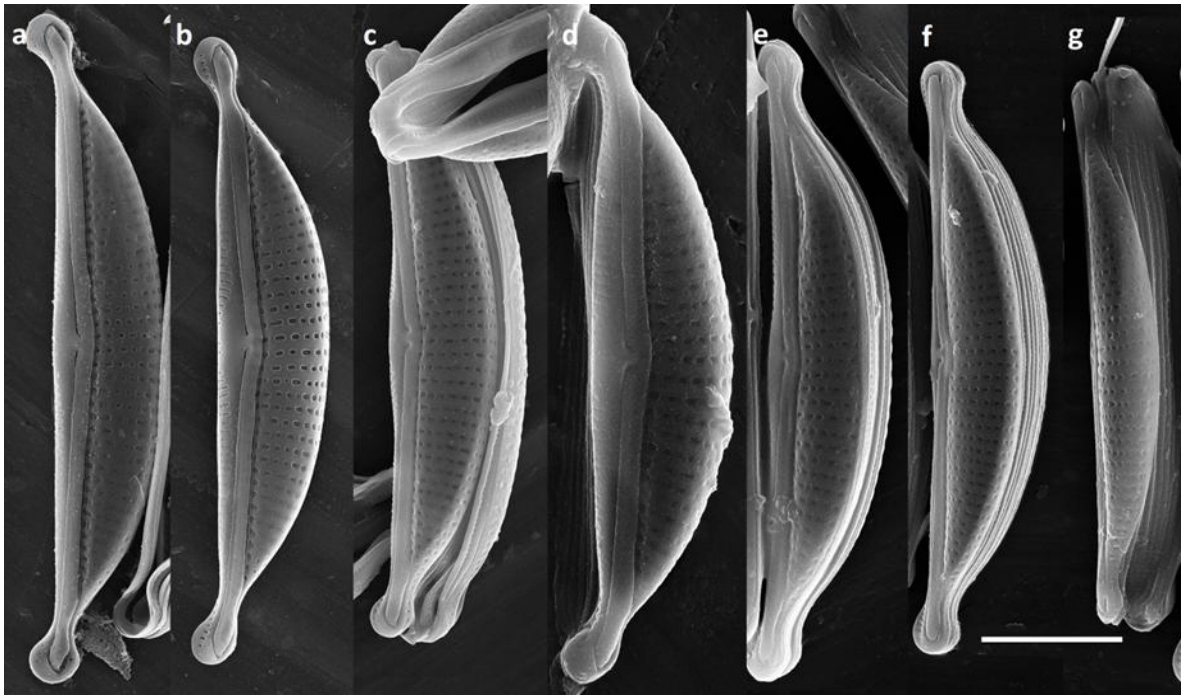

Figura 15. Vista valvar externa de los frústulos de *H. luciae* de cultivos en medio f/2 (a-c) y f/2 adicionado con zinc (d-g) cosechados el día 4. Escala: 5 µm.

Figura 16. Vista valvar externa de los frústulos de *H. luciae* de cultivos en medio f/2 (a-c) y f/2 adicionado con zinc (d-f) cosechados el día 9. Escala: 5 µm.

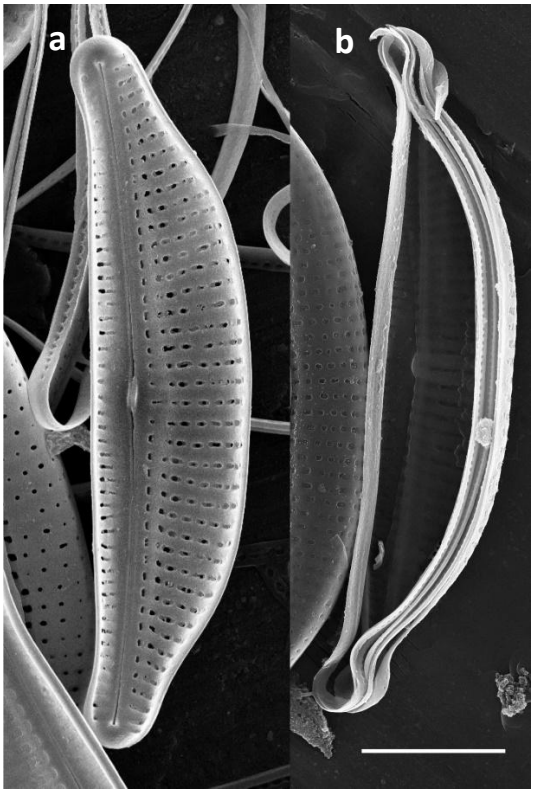

Figura 17. Vista valvar interna de los frústulos de *H. luciae* de cultivos en medio f/2 (a) y f/2 adicionado con zinc (b). Escala: 5 µm.

No se evidenciaron malformaciones o teratologías en los frústulos del tratamiento con metal. En cuanto a la ornamentación, el número de estrías en 10 µm no varió significativamente ($p>0,05$) entre control y tratamiento para ninguno de los dos puntos finales (Tabla 3). El diámetro de las areolas de la tercera estría contando desde la fisura proximal del rafe se redujo significativamente ($p<0,05$) en las células cultivadas en presencia de zinc para los dos tiempos finales (Tabla 3, Fig. 18).

Tabla 3. Valores morfometricos para los cultivos control (f/2) y tratamiento (50 µM Zn). Los valores están expresados como las medias ± DE para n=25 . Los asteriscos (*)indican diferencias significativas ($p<0,05$).

	Tratamiento	Estrías en 10 µm	Diámetro Areolas
Día 4	Control	20,22 ± 0,73	0,26 ± 0,06
	Tratamiento	19,97 ± 1,12	0,21 ± 0,02*
Día 9	Control	19,5 ± 0,9	0,18 ± 0,05
	Tratamiento	20,1 ± 0,7	0,11 ± 0,03*

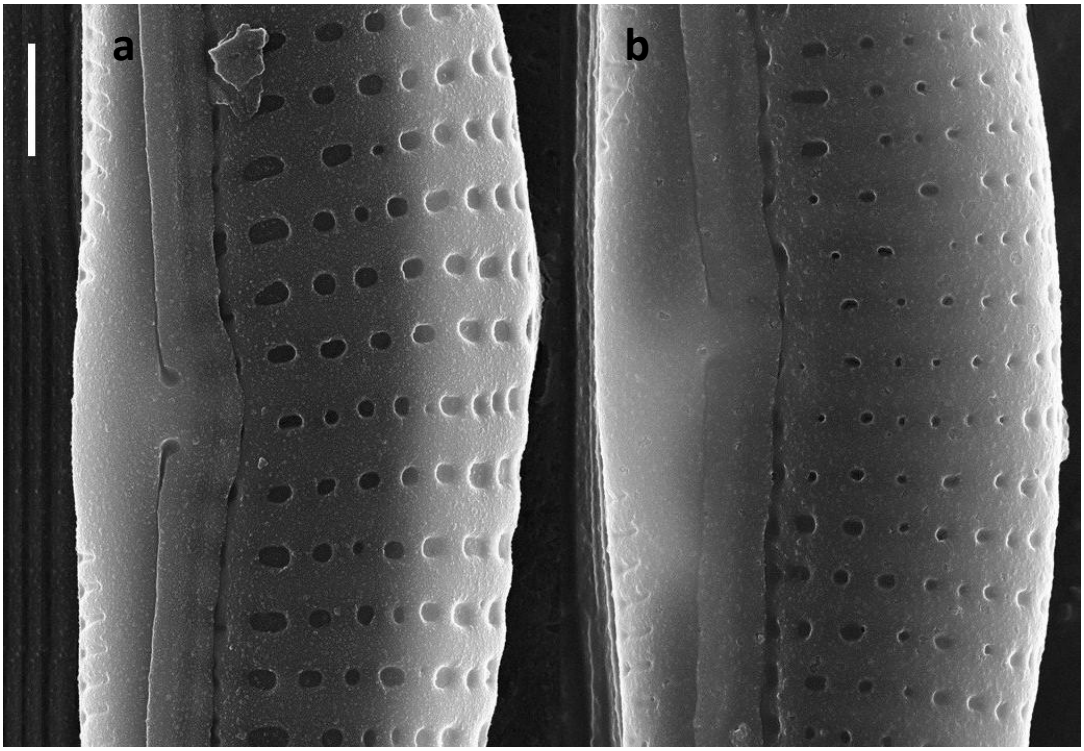

Figura 18. Valvas de *H. luciae* mostrando detalle de las areolas luego de 9 días de cultivo en medio f/ (a) yf/2 adicionado con zinc (b). Escala: 0,5 µm.

5.3.3. *Morfometría de los frústulos y relación superficie / volumen*

Las medidas morfométricas y el cálculo de superficie y volumen se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Eje apical (largo), eje pervalvar (ancho dorsal),eje transversal o transapical (ancho de valva) superficie y volumen de los frústulos de *Halamphora luciae* en medio f/2 (control) y f/2-Zn (tratamiento). Los valores corresponden a las medias ± DE para n=85. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (p<0,05) respecto del control.

	Tratamiento	Eje apical (µm)	Eje pervalvar (µm)	Largo/Ancho	Eje transversal (µm)	Biovolumen (µm3)	Área (µm2)	Area/Vol
Día 4	**Control**	23,46 ± 1,88	9,18 ± 1,03	2,59 ± 0,35	5,57 ± 0,34	472,4 ± 9,7	416,41 ± 4,63	0,89 ± 0,09
	Tratamiento	23,55 ± 1,63	10,11 ± 0,96*	2,35 ± 0,29*	5,8 ± 0,5 *	574,6 ± 11,2*	454,1 ± 4,8*	0,81 ± 0,09 *
Día 9	**Control**	23,3 ± 1,9	9,11 ± 1,02	2,59 ± 0,38	5,51 ± 0,33	461,1 ± 8,8	408,28 ± 3,42	0,89 ± 0,11
	Tratamiento	23,01 ± 1,77	9,98 ± 0,86*	2,33 ± 0,29	5,55 ± 0,29	534,7 ± 9,2*	428,1 ± 3,6*	0,81 ± 0,09 *

.

En presencia de zinc se registró un aumento significativo (p<0,05) de la superficie y volumen de los frústulos en ambos tiempos finales (Tabla 4). Este incremento es consecuencia del

mayor número de bandas de los cíngulos en la zona ventral de las células incubadas en presencia del metal (Fig. 19). Esto implica un aumento del eje pervalvar (b, en la fórmula, véase Materiales y Métodos4.4.1). El volumen creció 1,2 veces respecto del control mientras que la superficie lo hizo 1,05 veces. Como consecuencia, la relación superficie/volumen de las células se redujo significativamente ($p<0,05$) en el tratamiento en ambos puntos finales (Tabla 4).

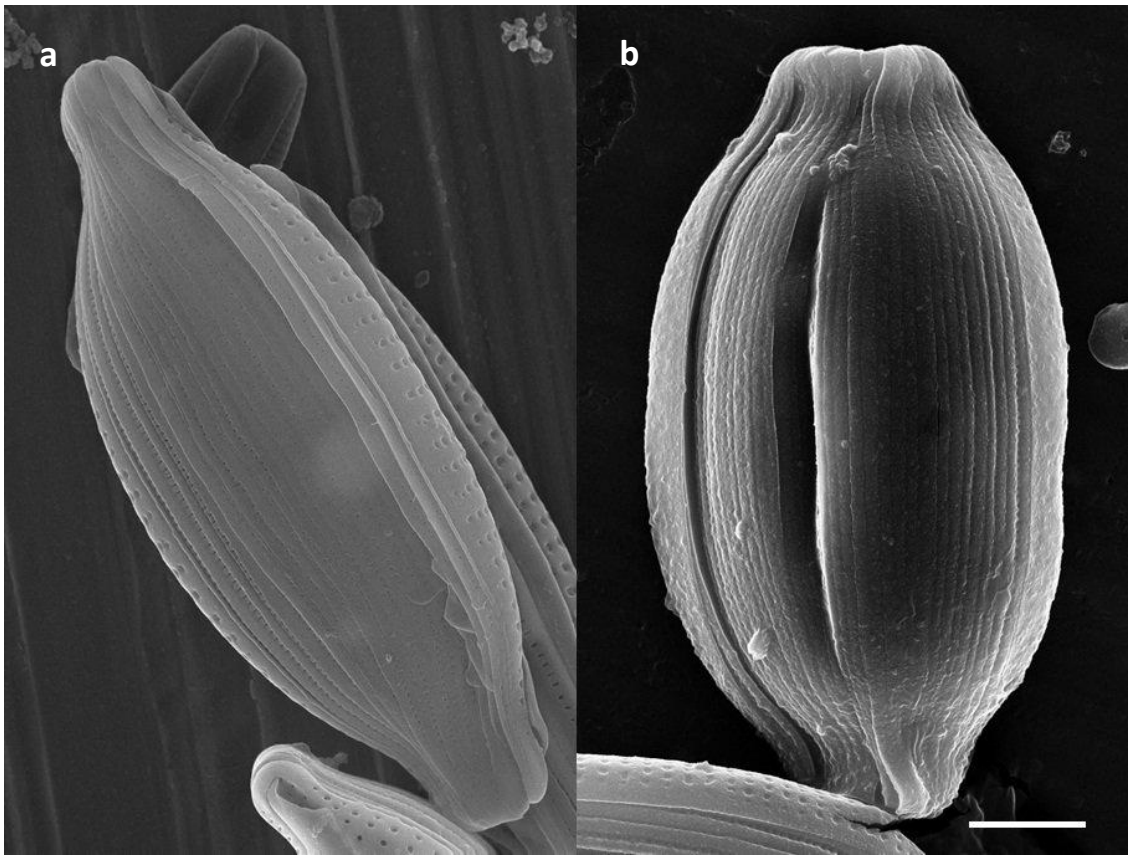

Figura 19. Valvas de *H. luciae* mostrando detalle del cingulo luego de 4 días de cultivo. Medio f/2, a;f/2 adicionado con zinc, b. Escala: 3 µm.

5.4. *Bioensayos de movilidad*

H. luciae posee rafe en las dos valvas, pero el cíngulo en el lado dorsal tiene mayor cantidad de bandas que en la cara ventral. Debido a ello, las células usualmente se desplazan manteniendo el rafe del cíngulo más delgado hacia el sustrato mientras que el más ancho queda hacia la cara superior. El tipo de trayectoria más frecuentemente observado fue recto. En algunos casos se evidenció una rotación de las células sobre el eje de desplazamiento semejante al de un sacacorchos (Fig. 20a). En estos casos, las células mostraban una vibración a medida que

avanzaban. En caso de encontrar un obstáculo (por ejemplo, otra célula), el movimiento se detenía y las algas permanecían en el mismo lugar o bien cambiaban la dirección. Para hacerlo, uno de los extremos permanecía adherido al sustrato lo que permitía al extremo libre opuesto adquirir un movimiento pivotante y variar la trayectoria (Fig. 20b). Estos patrones de movimiento se observaron tanto para el control como para el tratamiento en ambos tiempos finales.

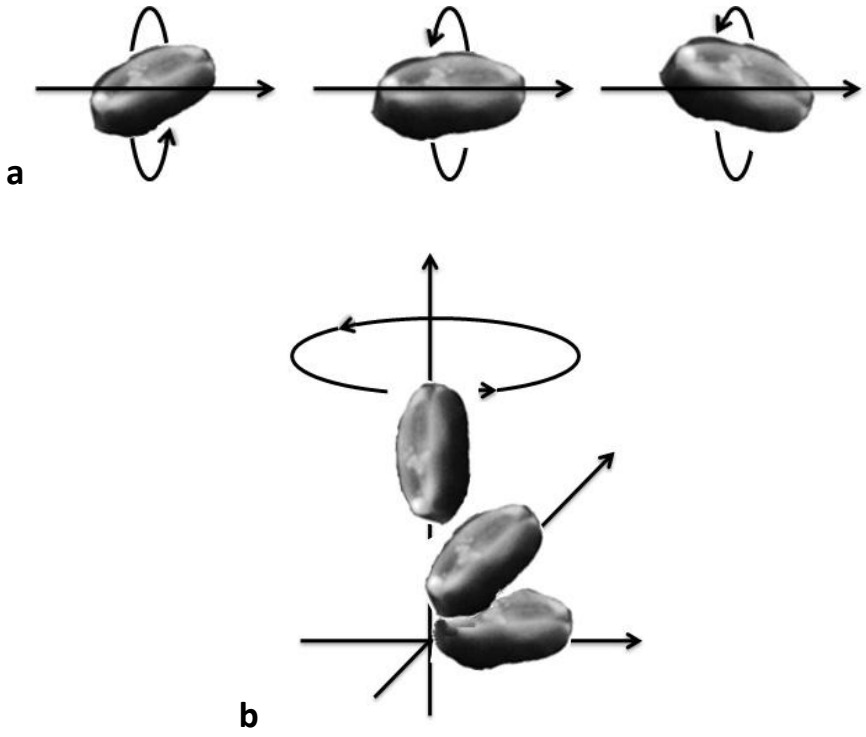

Figura 20. Patrones de movimiento observados en *Halamphora luciae*. a. Movimiento tipo sacacorchos. La célula gira alrededor de un eje. La flecha horizontal indica la dirección de desplazamiento. b. Mientras un extremo de la célula se mantiene fijo al sustrato el otro se mueve en forma pivotante o siguiendo una trayectoria circular. Como consecuencia el eje de desplazamiento puede adoptar diferentes direcciones en el plano (indicado por el sistema de coordenadas).

El porcentaje de células en movimiento fue significativamente ($p<0,05$) mayor para el tratamiento en el dia 4 (Fig. 21 a). Notablemente las células del cultivo control prácticamente no exhibieron ningún tipo de desplazamiento en el primer punto final. En el día 9 no hubo diferencias significativas ($p>0,05$) en el porcentaje de células en movimiento. Tanto para el control como para el tratamiento hubo un incremento significativo ($p<0,05$) en la cantidad de celulas en movimiento a lo largo del tiempo (Fig. 21a). En cuanto a la velocidad de desplazamiento, las células del control en el día 4 presentaron muy escasa o nula movilidad mientras que las células sometidas al estrés por zinc alcanzaron una velocidad media de desplazamiento de 1,43±0,21 μms^{-1} (Fig. 21 b). Hacia la fase estacionaria, las velocidades

media de desplazamiento presentaron diferencias significativas ($p<0,05$) entre tratamiento y control (control: 1,59 ± 0,21µm s^{-1}; Tratamiento: 1,91 ± 0,31µm s^{-1}) (Fig. 21b). En ambos casos hubo un aumento significativo ($p<0,05$) de la velocidad hacia la fase estacionaria.

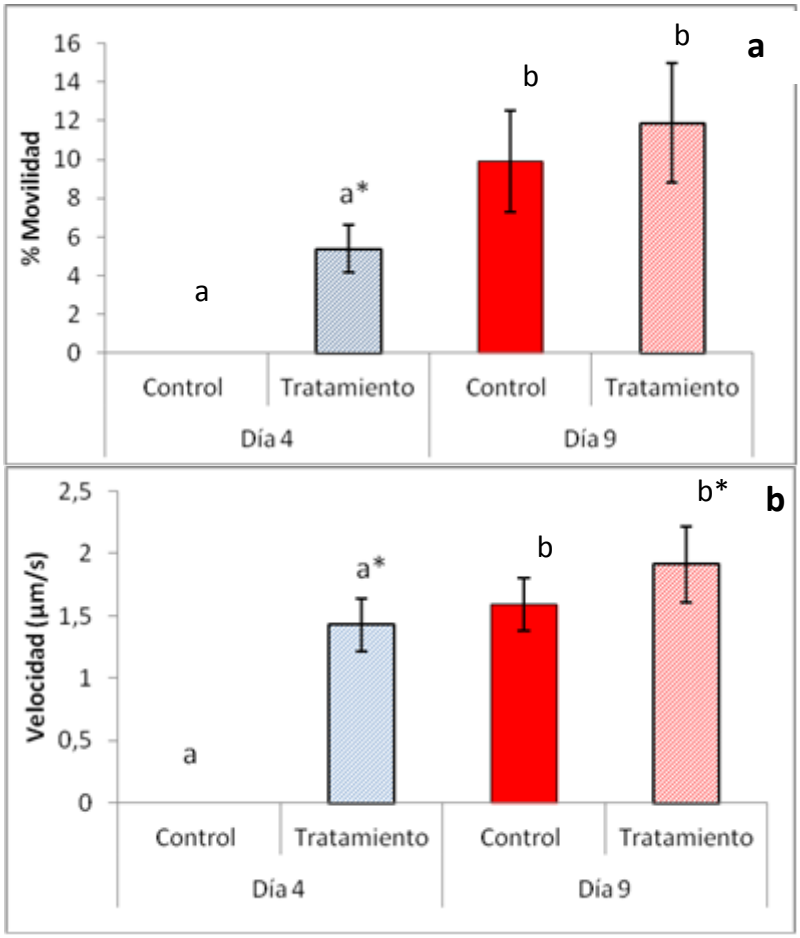

Figura 21. Movilidad de *Halamphora luciae*. a) Porcentaje de las células en movimiento en control y tratamiento para ambos tiempos finales. b) Velocidad de las celulas en control y tratamiento para ambos tiempos finales. Los resultados corresponden a la media ± DE para n=50. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p<0,05$) entre tratamientosy las letras hacen referencia a la comparación entre tiempos dentro de un mismo tratamiento.Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Concomitantemente con estos resultados, la tinción del mucílago con azul de toluidina reveló una escasa liberación de mucílago extracelular en un bajo porcentaje de células en el control del día 4 (Fig. 22 a-d), mientras que dicha secresión era más copiosa en las células correspondientes al tratamiento del mismo punto final (Fig. 22 e-h). En tanto, al día 9, la tinción histoquímica permitió visualizar abundante acumulación de huellas de mucilago tanto en el control como en el tratamiento (Fig. 23).

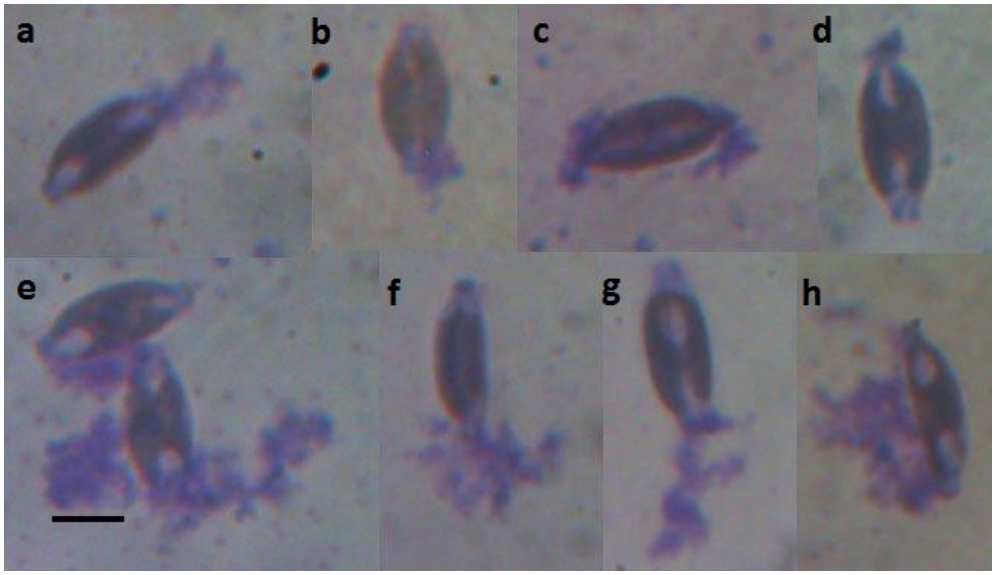

Figura 22. Tinción de mucílago extracelular de *H. luciae* con azul de toluidina. Día 4, medio f/2, a-d; medio f/2 adicionado con zinc, e-h. Escala: 10 µm.

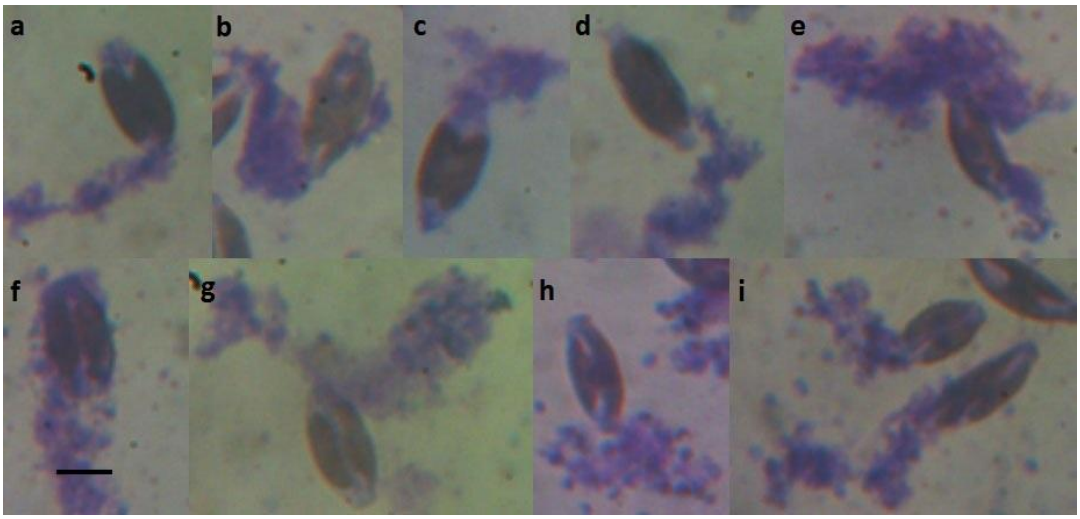

Figura 23. Tinción de mucílago extracelular de *H. luciae* con azul de toluidina. Día 9, medio f/2, a-e; medio f/2 adicionado con zinc, f-1. Escala: 10 µm.

5.5. *Medición de variables seleccionadas en los bioensayos*

5.5.1. *Cuantificación de proteínas totales*

El contenido de proteínas por peso fresco aumentó significativamente ($p<0,05$) en el tiempo, pero sólo a los 9 días se registró una disminución significativa ($p<0,05$) en el tratamiento (Fig. 24).

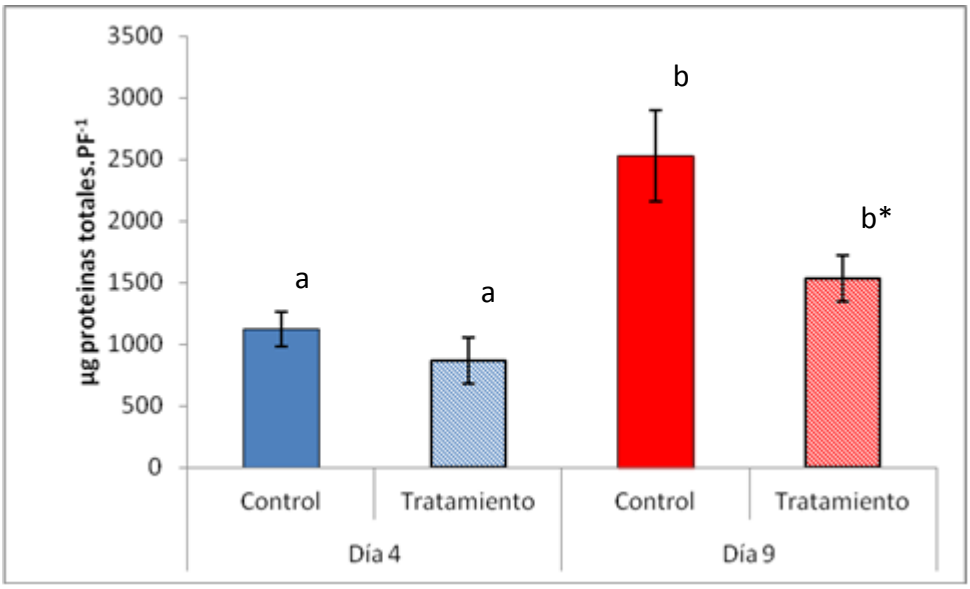

Figura 24. Cuantificación de proteínas totales ($\mu g.PF^{-1}$) en control y tratamiento en los dos puntos finales. Los resultados corresponden a la media ± DE para n=4. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p<0,05$) entre tratamientos y las letras hacen referencia a la comparación entre tiempos dentro de un mismo tratamiento. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$).

5.5.2. *Cuantificación de pigmentos fotosintéticos*

Se registró una reducción significativa ($p<0,05$) en los contenidos de clorofila *a*, clorofila *c*, carotenos y clorofila total (expresados en función del peso fresco) del tratamiento respecto del control para los dos puntos finales del bioensayo (Tabla 5). En cambio, el cálculo de la concentración de pigmentos en base al número de células no dio diferencias significativas ($p>0,05$) entre control y tratamiento para ninguno de los dos tiempos (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de pigmentos para los cultivos control (f/2) y tratamiento (50 µM Zn). Los valores están expresados como las medias± DE para n=4 . Los asteriscos (*)indican diferencias significativas respecto del control (p<0,05).

	Unidades	**Chl*a***		**Chl *c***		**Carotenos**		**Chl total**	
		Control	Tratamiento	Control	Tratamiento	Control	Tratamiento	Control	Tratamiento
Día 4	µg.ug PF^{-1}	422,3 ± 45,2	247 ± 15,9*	75,34 ± 11,7	46,1 ± 5,5*	148,7 ± 16,3	86,3 ± 6,9*	497,7 ± 56,4	293,1 ± 21,2*
	µg.1000 cel^{-1}	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,001	0,02 ± 0,002	0,02 ± 0,002	0,07 ± 0,008	0,08 ± 0,007
Día 9	µg.ug PF^{-1}	503 ± 31	380,4 ± 17,1*	103 ± 11,7	73,5 ± 3,6*	198,3 ± 9,1	152,1 ± 7,2*	606,0 ± 42,8	453,8 ± 20,3*
	µg.1000 cel^{-1}	0,06 ± 0,001	0,07 ± 0,004	0,01 ± 0,0006	0,01 ± 0,001	0,03 ± 0,001	0,03 ± 0,002	0,08 ± 0,005	0,08 ± 0,005

Las relaciones clorofila *a*/clorofila *c* y carotenos/clorofila total no mostraron diferencias significativas (p>0,05) entre control y tratamiento, independientemente de la unidad empleada (Tabla 6). Estos cocientes suelen utilizarse como indicadores de las variaciones del tamaño de las antenas. Por ejemplo, el aumento en la relación clorofila *a*/clorofila *c* se utiliza para indicar una disminución del tamaño de la antena. Según nuestros resultados, e independientemente del modo de expresión de la cuantificación de pigmentos, no habría variaciones significativas en el tamaño de las antenas.

Tabla 6. Valores de las relaciones de los pigmentos para los cultivos control (f/2) y tratamiento (50 µM Zn). Los valores están expresados como las medias±DE para n=4. No hay diferencias significativas.

	Unidades	**Chla/Chl c**		**Carot /chl total**	
		Control	Tratamiento	Control	Tratamiento
Día 4	Base PF	5,8 ± 0,3	5,5 ± 0,34	0,30 ± 0,002	0,30 ± 0,003
	Base cél.	5,8 ± 0,3	5,5 ± 0,3	0,30 ± 0,002	0,30 ± 0,003
Día 9	Base PF	5,0 ± 0,4	5,2 ± 0,1	0,31 ± 0,01	0,34 ± 0,006
	Base cél.	5,0 ± 0,3	5,2 ± 0,1	0,33 ± 0,01	0,34 ± 0,007

5.5.3. *Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)*

Si bien se registró un aumento significativo en la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico con el tiempo (Fig. 25) no se registraron diferencias significativas (p>0,05) entre los controles y los tratamientos en los dos tiempos finales ensayados.

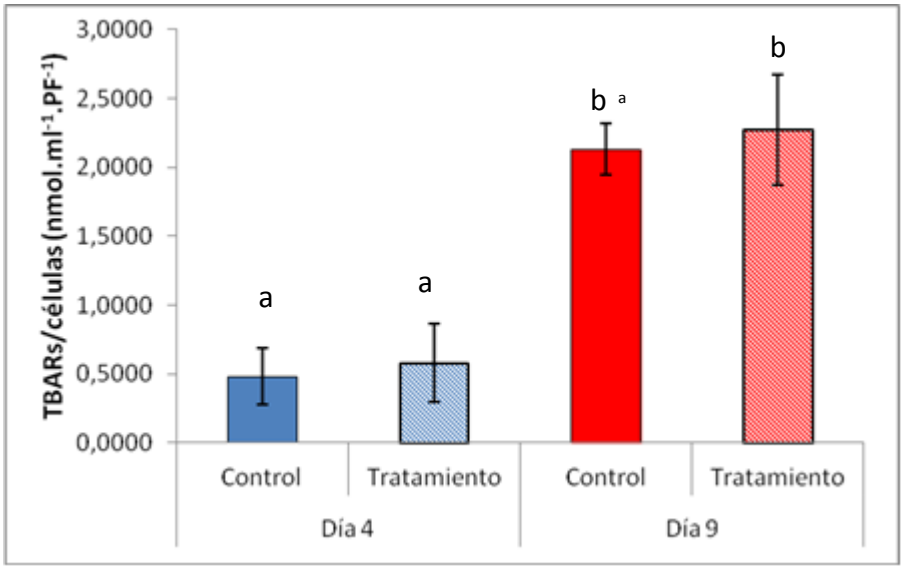

Figura 25. Cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (nmol MDA. PF^{-1}) en control y tratamiento en los dos puntos finales. Los resultados corresponden a la media ± DE para n=4. Las letras hacen referencia a la comparación entre tiempos dentro de un mismo tratamiento. Las letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05).

5.5.4. *Determinación de compuestos fenólicos*

En el día 4 y 9 se registró una disminución significativa (p<0,05) de los compuestos fenólicos en los cultivos tratados con el metal (Fig. 26). Respecto del tiempo, tanto el control como el tratamiento, mostraron un aumento significativo (p<0,05) de los compuestos fenólicos.

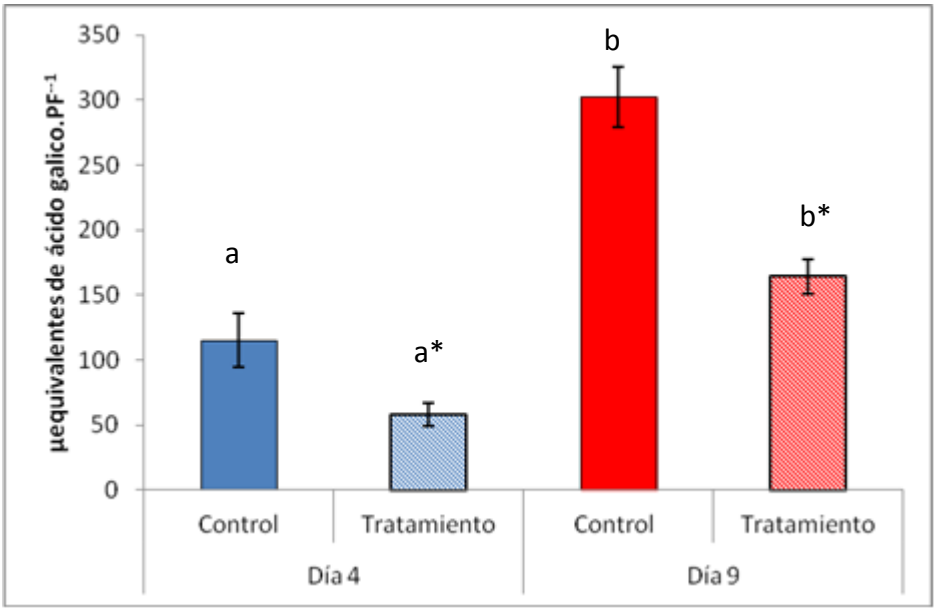

Figura 26. µequivalentes de ácido galico.PF^{-1} en control y tratamiento para ambos tiempos finales. Los resultados corresponden a las medias±DE para n=4. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p<0,05$) entre tratamientos, y las letras hacen referencia a la comparación entre tiempos dentro de un mismo tratamiento. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$).

5.5.5. *Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD)*

La actividad SOD fue significativamente ($p<0,05$) mayor en las células del tratamiento en la etapa aguda (Fig. 27).En la fase estacionaria, la actividad enzimática disminuyó tanto para el control como para el tratamiento, no registrándose diferencias significativas ($p>0,05$) entre ambos. En el caso de las células expuestas al metal, la actividad SOD disminuyó significativamente ($p<0,05$) con el tiempo al compararla con el tratamiento del día 4; en cambio en el control no hubo variación significativa ($p>0,05$) en el tiempo.

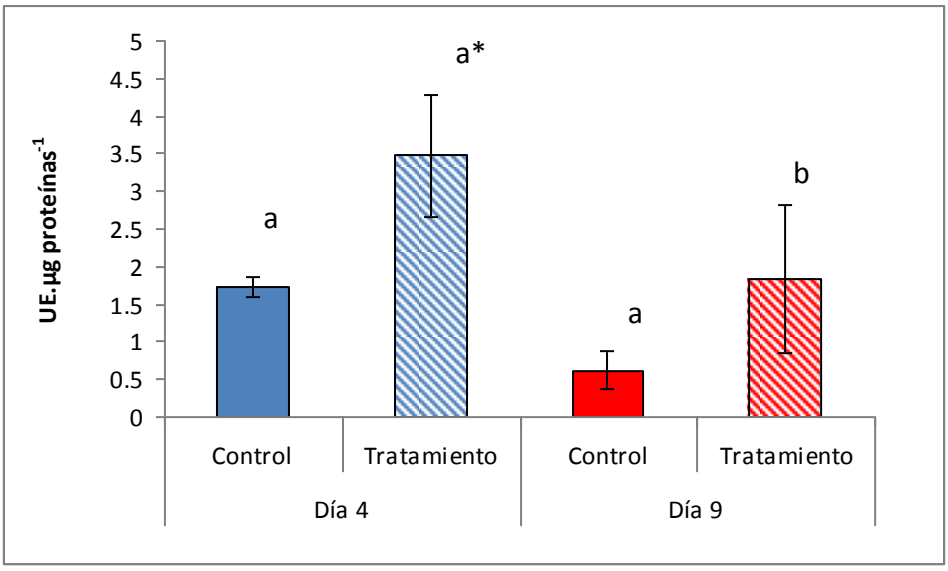

Figura 27. Actividad de la superoxido dismutasa (UE.µg proteínas^{-1}) en control y tratamiento para ambos tiempos finales. Los resultados corresponden a las medias±DE para n=3. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p<0,05$) entre tratamientos y las letras hacen referencia a la comparación entre tiempos dentro de un mismo tratamiento. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$).

5.5.6. *Estimación de la concentración de hidratos de carbono en los sEPS.*

No se encontraron diferencias significativas ($p<0,05$) en los hidratos de carbono totales de los sEPS correspondientes tanto a los cultivos control como a los tratamientos en ambos puntos finales (Fig. 28).

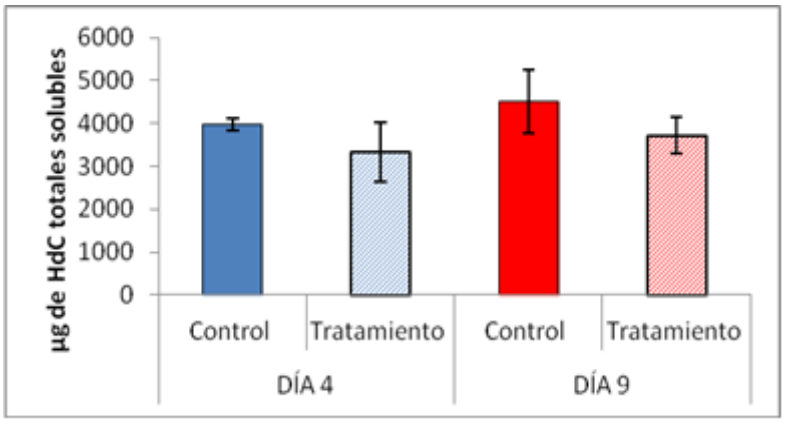

Figura 28. Hidratos de carbonos totales extracelulares (µg) en control y tratamiento en los dos puntos finales. Los resultados corresponden a la media ± DE para n=4. No hay diferencias significativas.

5.5.6.1. *Caracterización preliminar de las sustancias poliméricas extracelulares solubles en el medio de cultivo.*

La Fig. 29 muestra el perfil de elución de los sEPS obtenidos por concentración de los medios de cultivo libres de células del día 9 de control y tratamiento. El perfil de elución resultó diferente para control y tratamiento. Mientras que para los sEPS provenientes del medio f/2 dieron dos picos bien definidos (C1 y C2), los provenientes del medio f/2+Zn no mostraron, especialmente hacia la zona de menor peso molecular, un punto de corte neto entre fracciones. Tanto para control como tratamiento, la primera fracción (productos C1 y T1) se obtuvieron libres de sales, mientras que las siguientes (C2 y T2) dieron reacción positiva de cloruros con nitrato de plata. Esto también explica la mayor masa obtenida para estas fracciones (Tabla 7). El contenido de hidratos de carbono no superó en ningún caso el 0,14%.

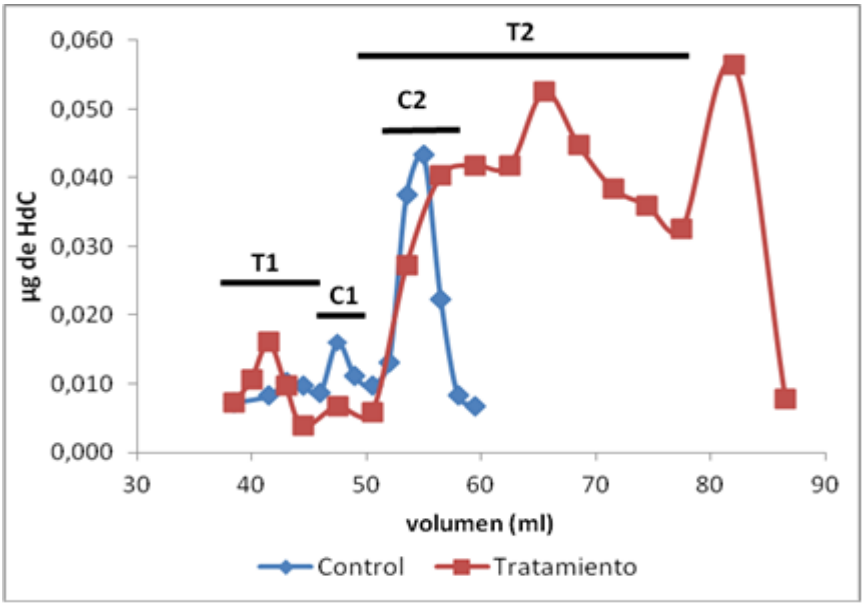

Figura 29. Perfil de curva de elusión correspondiente a los hidratos de carbonos totales extracelulares (µg) en control y tratamiento en día 9.

Tabla 7. Rendimiento (mg) y % de HdC totales para los cultivos control (f/2) y tratamiento (50 µM Zn) para las fracciones 1 y 2 de Bio-Gel P2.

Tratamiento	Fracciones	Rendimiento (mg)	HdC totales (%)
Control	C1	35	0,14
	C2	170	0,11
Tratamiento	T1	125	0,08
	T2	3.353	0,01

El análisis de los monosacáridos componentes de las subfracciones de la columna de Bio-Gel (Tabla 8) mostró que tanto para controles como para tratamiento el pico de mayor peso molecular contenía principalmente glucosa y galactosa junto con porcentajes molares menores de ramnosa, fucosa, xilosa y manosa. Sin embargo, en la subfracción T1 los monosacáridos minoritarios aparecieron con porcentajes mayores que en C1. Así, el porcentaje de ramnosa se cuadruplicó, los de fucosa y manosa se triplicaron y el de xilosa se duplicó, sugiriendo una mayor heterogeneidad del producto. El pico de menor peso molecular en ambos casos contenía glucosa como monosacárido mayoritario.

Tabla 8. Porcentaje molar de los picos 1 y 2 correspondientes al control y al tratamiento.

	% Molar			
Monosacárido	Control Pico 1	Control Pico 2	Tratamiento Pico 1	Tratamiento Pico 2
Ramnosa	3	0	12	0
Fucosa	3	0	9	0
Xilosa	2	tr	5	0
Manosa	3	3	9	0
Galactosa	35	1	24	0
Glucosa	54	96	41	100

6. Discusión

Efecto del zinc sobre el crecimiento de Halamphora luciae

El crecimiento es un buen indicador de la acción tóxica de los metales en microalgas (Torres *et al.* 1997; Miao *et al.* 2005). En *Halamphora luciae*, a excepción de la mayor concentración de zinc ensayada (120 µM), la exposición a concentraciones crecientes del metal no alteró la tasa de crecimiento exponencial. Sin embargo, el estrés por concentraciones de metal mayores que 20 µM, llevó a una disminución significativa ($p<0,05$) de la capacidad de carga o de la máxima densidad celular. Resultados semejantes fueron informados por Nguyen-Deroche *et al.* (2012) para *Amphora acutiuscula* y *A. coffeaeformis* y por Horvartic y Persic (2007) para *Phaeodactylum tricornutum.* El zinc también produjo una reducción en la densidad final de células luego de 72 h de exposición en *Planothidium lanceolatum* (Sbihi *et al.* 2012). La CI50, que tiene en cuenta la fase exponencial, nos indica cómo el metal afecta la tasa de crecimiento específica de la especie mientras que la biomasa final o capacidad de carga provee información sobre el grado de aclimatación de la población. En este caso, si bien la tasa de crecimiento específica no varió, el estrés por metal creciente en el medio limitó la capacidad de carga de la población.

Los valores de CI50 en la literatura no siempre son comparables ya que las condiciones de realización de los bioensayos difieren entre los distintos autores. Por ejemplo, el tipo de recipiente de cultivo (cristalizador, Erlenmeyer, placa de pocillos, etc), el medio de cultivo, el punto final del bioensayo, la utilización o no de quelantes en el medio, etc.

Un punto a tener en consideración es la densidad inicial de los inóculos. Franklin *et al.* (2002) señalan que las densidades celulares elevadas y la duración del bioensayo pueden devenir en variaciones de los resultados. Las paredes celulares y los mucílagos tienen grupos aniónicos con carga neta negativa que actúan como ligandos para la unión de cationes metálicos. Por lo tanto, una densidad celular inicial elevada ofertará mayor cantidad de ligandos y por ende menor cantidad de cationes metálicos por célula, aminorando los efectos tóxicos del metal en el bioensayo (Steemann Nielsen y Kamp-Nielsen 1970). Densidades celulares superiores a 10^4 o 10^5 células. ml^{-1} en bioensayos de laboratorio pueden llevar a una subestimación de la toxicidad del metal (Franklin *et al.* 2002). En nuestro caso, este efecto puede desestimarse ya que utilizamos un orden de magnitud menor de células en el inóculo.

Los cationes metálicos libres son, generalmente, las especies tóxicas. El balance entre el catión divalente libre y las formas ligadas responde a equilibrios químicos que variarán dependiendo de factores físico-químicos como la temperatura, el pH, la presencia de materia orgánica y quelantes o la concentración de oxígeno disuelto. Para el zinc, al pH del medio f/2 (7,9-8) la

formación de complejos inorgánicos de hidróxido de zinc será despreciable frente a la unión a carbonatos o silicatos (Pagenkopf 1986), siendo los últimos particularmente relevantes en la superficie de los frústulos (Fig.30) (Arkas y Tsiourvas 2009). Por otro lado, los polímeros extracelulares del mucílago (EPS) y los de menor peso molecular disueltos en el medio de cultivo (sEPS) actuarán como ligandos orgánicos. Por lo tanto, la comparación con las concentraciones nominales de zinc agregadas a los medios de cultivo no reflejan la concentración real del catión divalente en solución.

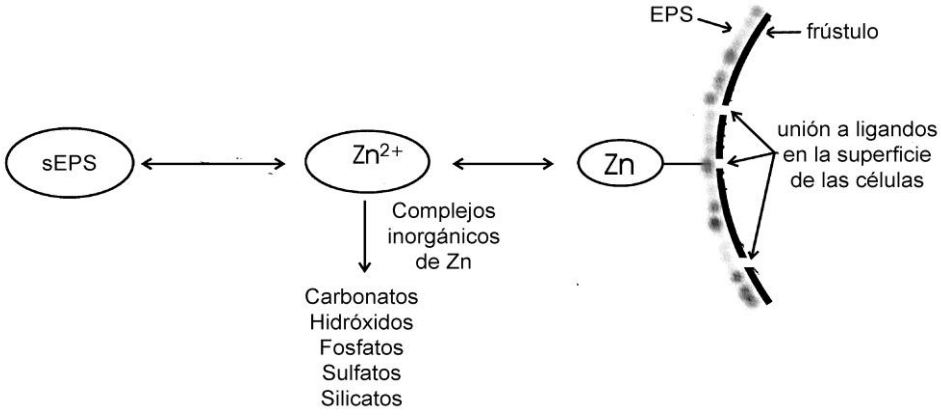

Figura 30. Equilibrios químicos entre el catión divalente libre (Zn^{2+}) y su unión a ligandos inorgánicos y orgánicos, como los polímeros extracelulares del mucílago (EPS) y los solubles en el medio de cultivo (sEPS).

La Tabla 9 resume los datos de la bibliografía de bioensayos realizados en condiciones semejantes a las utilizadas en el presente trabajo. Del análisis de los datos de esta tabla surge que las especies más frecuentemente encontradas en las comunidades fitoplanctónicas (*Asterionella japonica, Nitzschia closterium, Conticriba weissflogii, Fragilaria capucina*, *Fragilaria gracilis*) son relativamente más sensibles al metal.

La cepa utilizada en este trabajo fue aislada a partir de muestras de los sedimentos superficiales de la planicie de marea del estuario de Bahía Blanca. Ferrer *et al.* (2003) midieron en el área del estuario una concentración de zinc disuelto al menos 10 veces menor que la asociada a los sedimentos o a la materia particulada en suspensión. Además de la mayor concentración de metales en los sedimentos, debe tenerse en cuenta que las diatomeas bentónicas integran biofilms, que se definen como un consorcio de organismos autótrofos y heterótrofos inmersos en una matriz de polímeros y partículas (Decho 2000). A medida que

Tabla 9. Compilación de valores de CI50 para distintas especies de diatomeas

Especie	CI50 (µM)	Referencia
Asterionella japonica	0,76	Masmoudi *et al.* 2013
Amphiprora hyalina	140	Masmoudi *et al.* 2013
Amphora coffeaeformis	94	Masmoudi *et al.* 2013
Nitzschia closterium	13	Masmoudi *et al.* 2013
Planothidium lanceolatum	23	Sbihi *et al.* 2012
Conticriba weissflogii	14	Souza-Machado *et al.*2014
Fragilaria capuchina cepa 2	23	Hedenborg 2016
Fragilaria capuchina cepa1	17	Hedenborg 2016
Fragilaria gracilis	8	Hedenborg 2016
Halamphora luciae	52	Presente trabajo

progresa su maduración, predomina el reciclado de materiales y se reduce la dependencia de las condiciones externas. Una de las propiedades de los biofilms es su capacidad de acumular metales en concentraciones mucho más elevadas que las encontradas en la columna de agua (Ivorra *et al.*2000). Por lo visto anteriormente, la difusión de los metales a través de los biofilms dependerá de las propiedades adsortivas de la materia particulada y de la densidad de cargas netas negativas de los polímeros del mucílago. Cuanto más grueso el biofilm, más lenta será la difusión (Ivorra *et al.* 2000).

Dado que la cepa de *Halamphora luciae* empleada en el presente trabajo proviene de un ambiente con alta carga de metales pesados, podría suponerse que se trata de una especie aclimatada al crecimiento en presencia de elevadas concentraciones de zinc. La comparación de su CI50 con valores de la bibliografía (Tabla 9) sugiere que se trata de una cepa de tolerancia media al metal. Debe tenerse en cuenta que esta cepa se mantiene en cultivo por repiques constantes en medio f/2 no enriquecido con metales desde el año 2013 disminuyendo su grado de aclimatación a elevadas concentraciones del metal.

Morfología y morfometría

La exposición a condiciones de estrés pueden generar diversas repuestas tanto fisiológicas como morfológicas en las algas. Las observaciones al microscopio óptico revelaron el aumento de tamaño de los cuerpos lipídicos en las células de *Halamphora luciae* expuestas al zinc. Un efecto similar fue informado por Pandey y Bergey (2016) para diatomeas del perifiton de sitios expuestos a una elevada contaminación con este metal.

Un efecto general de los metales pesados son los cambios en la forma y / o tamaño de los frústulos (Dickman 1998, Gold *et al.* 2003; Cattaneo *et al.* 2004; Falasco *et al.* 2009; Morin *et al.* 2014).

Falasco *et al.* (2009) plantean que existe una considerable confusión entre formas polimórficas y teratológicas en la literatura de diatomeas y que no siempre resulta sencillo establecer el límite entre ambos fenómenos.

Las sucesivas divisiones celulares en las diatomeas imponen una reducción de tamaño celular de la población. En este caso, dicha reducción se trasmitirá de generación en generación en forma constante y reproducible y por lo tanto no puede ser considerada una teratología (según Falasco *et al.* 2009). Además de las variaciones de tamaño, existen caracteres que no son constantes dentro de una especie. Esto dificulta la identificación ya que la distinción entre especies de diatomeas se basa principalmente en la ornamentación del frústulo. Por ejemplo, caracteres como las espinas, el rafe, las areolas, etc., exhiben variaciones fenotípicas dentro de una población (Cox 2006). En tal sentido, se podría considerar como polimorfismo a los cambios en el diámetro y forma de las areolas observados en los cultivos de *H. luciae* expuestos al zinc. Se interpreta que los polimorfismos aparecen como una expresión del acervo genético de la población en respuesta a cambios ambientales. Por lo tanto, pueden considerarse como una respuesta adaptativa a la presión de selección impuesta por cambios ambientales en el tiempo y el espacio. Son cambios hereditarios que aumentan las probabilidades de éxito de la población y/o de la especie ante condiciones ambientales adversas. En este caso, la reducción del diámetro de las areolas atenuaría el contacto con el medio enriquecido en el metal pesado.

Contrariamente a los polimorfismos, las teratologías no son hereditarias y constituyen una respuesta a las tensiones ambientales agudas o crónicas, tanto naturales como antropogénicas (Falasco *et al.* 2009). En consecuencia, se puede establecer una relación entre su frecuencia y gravedad con la magnitud del estrés.

En nuestro trabajo no se encontraron deformaciones o aberraciones en los frústulos en el tratamiento con zinc, por fuera del rango de las variaciones propias de la especie. Sin embargo, ante la exposición al metal, se registró un aumento en el eje pervalvar por la adición de bandas en el cíngulo, mientras que no se presentaron modificaciones significativas en el largo del frústulo. Estas diferencias aparecieron tempranamente en la fase exponencial (día 4) y se mantuvieron en la fase estacionaria (día 9).

Debido al incremento del ancho del frústulo, las células expuestas al metal aumentaron el volumen y el área, aunque dicho acrecentamiento fue desigual y menor para el área que para el volumen. Como consecuencia, disminuyó la relación Superficie/Volumen en las células del tratamiento con metal.

La disminución de la relación Superficie/Volumen tiene connotaciones fisiológicas importantes. La difusión de moléculas, ya sea hacia adentro o hacia afuera de la célula encuentra una resistencia mayor por que disminuye el área superficial de membrana y el número de transportadores al tiempo que aumenta la distancia que debe recorrer la molécula que difunde (Raven y Kubler 2002). Por otro lado, el empaquetamiento de los pigmentos fotosintéticos en células de mayor volumen disminuye la eficacia de excitación de los fotosistemas (Raven 1984). Si suponemos una concentración constante de clorofila *a* por volumen celular, debido al empaquetamiento cada molécula de pigmento tendrá menor probabilidad de absorber fotones cuanto menor sea la relación Superficie/Volumen de la célula. Esta reducción de la eficiencia fotosintética tendría como consecuencia la disminución de la producción de biomasa (Sarthou *et al.* 2005). En nuestro caso, si bien no medimos la eficiencia cuántica de la fotosíntesis, se observó una reducción de la biomasa en las células expuestas al metal conjuntamente con la caída de su relación Superficie/Volumen.

Movilidad celular

En los ambientes acuáticos, la migración celular en respuesta a los estímulos químicos, como la presencia de un contaminante, le confiere a las células la ventaja de poder alejarse de un ambiente adverso (Coquillé *et al. 2015*). En *H. luciae*, el porcentaje de células en movimiento aumentó en los tratamientos, en especial en la fase aguda. Hacia la fase estacionaria, si bien las células expuestas al metal mostraban una tendencia hacia la mayor movilidad, esta respuesta no difería de la de los controles. Estos resultados contradicen los de Gupta y Agrawal (2007) quienes señalan que metales pesados como el zinc, el cobre, el cobalto, el mercurio, el

níquel y el hierro tienen un efecto inhibitorio tanto sobre el porcentaje de células en movimiento como en la velocidad de desplazamiento. Cabe señalar que las concentraciones de metales ensayadas por estos autores son al menos dos órdenes de magnitud superiores a las nuestras. La respuesta de las células de *H. luciae* en la etapa aguda de exposición al zinc se hacen más evidentes cuando se comparan las velocidades de desplazamiento y la abundancia de secreción de mucílago en tratamientos y controles en los dos puntos finales. Por lo tanto, en *H. luciae*, la medición de los porcentajes de células en movimiento como de la velocidad de desplazamiento en la etapa aguda de exposición al zinc pueden ser utilizados como indicadores en bioensayos de laboratorio.

Indicadores de la toxicidad de zinc medidos en el presente trabajo

a. *Pigmentos fotosintéticos*

La cuantificación de los pigmentos fotosintéticos, y en especial la relación entre la clorofila *a* y los pigmentos del complejo antena (en este caso clorofila *c*, xantofilas y carotenos) reflejan cambios en el tamaño y composición de los fotosistemas (Melis 1991), siendo el fotosistema II y su complejo antena asociados los más susceptibles al ataque por metales pesados (Küpper *et al.* 2002).

La concentración de pigmentos fotosintéticos expresada en función del peso fresco mostró una disminución significativa ($p<0.05$) en presencia de zinc. Por otro lado, dicha disminución no fue significativa ($p>0,05$) si se tiene en cuenta la cuantificación en base al número de células. De una u otra forma, la relación entre pigmentos del centro de reacción (clorofila *a*) y pigmentos de antena (clorofila *c* y carotenos) no mostró variaciones, sugiriendo que el metal no provocó cambios significativos en la composición de los fotosistemas. Según estos resultados, el porcentaje de inhibición en la biomasa final provocado por el metal no estuvo acompañado de cambios en la composición de pigmentos, tal como observaron Markina y Aizdaicher (2006) y Gagneux-Moreaux *et al.* (2006). En concomitancia no se observó decoloración en las células de *Halamphora luciae.*

La respuesta al estrés por metal puede variar entre especies. Por ejemplo, Nguyen-Deroche *et al.* (2012) registraron variaciones en el contenido de clorofila total y/o en la relación clorofila *a* /clorofila *c* en *Amphora acutiuscula* y *A. coffeaeformis* mientras que no registraron tales cambios para *Nitzschia palea* y *Entomoneis paludosa.*

Küpper *et al.* (1998) utilizando intensidades lumínicas bajas y semejantes a las del presente trabajo, informaron que el contenido de clorofila total de plantas expuestas a Zn^{2+} disminuye solo levemente, en lo que estos autores denominaron condiciones de sombra. En presencia de Zn^{2+}, el Mg^{2+} de la clorofila *a* es sustituido por el metal lo que la torna inactiva. Como consecuencia, la eficiencia fotosintética disminuye, aun cuando no se registren cambios en el contenido de pigmentos. Si la producción de biomasa de organismos autótrofos está estrechamente ligada a la tasa fotosintética, es de esperar que si esta disminuye también lo haga la densidad celular, como se observó en el presente trabajo.

b. TBARs y compuestos fenólicos

El daño por oxidación en los lípidos, estimado a partir de la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) y la acumulación de compuestos fenólicos, suelen utilizarse como indicadores de estrés oxidativo. La respiración, y en especial la fotosíntesis en organismos autótrofos son una fuente potencial de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mittler 2002; Rochetta y Küpper 2009). Las células poseen una batería de metabolitos y enzimas antioxidantes que contrarrestan el estrés oxidativo producto de las vías troncales de obtención de energía. Sin embargo, ante ciertas condiciones ambientales (irradiancias altas, incremento de la salinidad, metales pesados y herbicidas, etc.) el incremento en la producción de ROS puede sobrepasar la capacidad de los mecanismos detoxificantes celulares (Pinto *et al.* 2003).

El aumento de TBARs en *H. luciae* fue dependiente del tiempo y no de la exposición al metal, hecho que se relaciona con el proceso de envejecimiento natural del cultivo. La peroxidación masiva de lípidos desencadenada por la formación de ROS en el cloroplasto lleva a la alteración de la arquitectura de complejo sistema de membranas fosfolipídicas de los tilacoides. En este sentido, la variación no significativa de la relación clorofila *a* / pigmentos antena es consistente con la cuantificación de TBARs.

Aunque la medición de compuestos fenólicos fue mayor hacia el día 9, tanto para los controles como para los tratamientos, los cultivos expuestos al metal siempre mostraron una reducción significativa de los compuestos fenólicos ($p<0.05$) respecto de los controles. Murugan y Harrish (2007) obtuvieron resultados semejantes para el alga verde filamentosa *Cladophora glomerata* pero estos autores indicaron que la disminución del contenido de fenoles está acompañada del aumento de TBARs, contrariamente a lo observado en el presente trabajo.

c. Contenido de proteínas

El contenido de proteínas disminuyó significativamente ($p<0,05$) en los cultivos expuestos al metal hacia la fase estacionaria, coincidiendo con el aumento de tamaño de los cuerpos lipídicos. Esto sugiere que la exposición al metal activó la "etapa lipogénica" en la diatomea (Hu *et al*. 2008; Levitan *et al*. 2015). Recientemente, se postuló un mecanismo de distribución del C en la diatomea modelo *Phaeodactylum tricornutum* (Alipanah *et al*. 2015; Levitan *et al.* 2015). Ante estrés ambiental, *P. tricornutum* canibaliza y moviliza las proteínas de los cloroplastos y utiliza sus esqueletos carbonados como sustrato respiratorio para la obtención de energía. Las diatomeas pueden llegar a acumular hasta el 60% de su peso fresco como ácidos grasos poli-insaturados citoplasmáticos (Pulz y Gross 2004). Si bien no fue cuantificado en el presente trabajo, la disminución del contenido de proteínas también podría responder a la oxidación de dichas macromoléculas en presencia de zinc.

El efecto de la exposición al zinc sobre el contenido de proteínas puede variar con la especie. Por ejemplo, Rijstenbil *et al.* (1994 a,b) encontraron una reducción en *Thalassiosira pseudonana* pero no en *Ditylum brightwellii.*

d. Actividad Superóxido Dismutasa

La actividad de esta enzima detoxificante aumentó únicamente en la etapa aguda de exposición al zinc. El resultado de la peroxidación lipidica podría estar relacionado con la eficaz detoxificación de ROS (anión superóxido) de esta enzima, aunque a expensas de la disminución en la producción final de biomasa, conjuntamente con otros mecanismos de detoxificación tanto enzimáticos como no enzimáticos no medidos en el presente trabajo. Rijstenbil et al. (1994 a) señalan que la modulación de la actividad SOD a la exposición al zinc es especie-dependiente, yendo desde un incremento en *Thalassiosira pseudonana* hasta la disminución en *Ditylum brightwellii*. Por otro lado, Nguyen- Deroche *et al.* (2012), no observan variación significativa en la actividad SOD en la fase exponencial delos cultivos de las diatomeas *Amphora coffeaeformis*, *Amphora acutiuscula*, *Entomoneis paludosa* y *Nitzschia palea.*

e. Mecanismos de exclusión celular del metal: composición de los sEPS

Los sEPS se componen de productos de bajo peso molecular (Underwood y Paterson 2003) originados por solubilización parcial del mucílago extracelular insoluble (no analizado en el presente trabajo). Es frecuente observar que el contorno de las huellas de mucílago que deja la

diatomea al desplazarse sobre una superficie va perdiendo nitidez a medida que se hidrata y comienza a solubilizarse (Daglio *et al.* 2016).

La separación por columna de permeación de geles permitió obtener en ambos casos un producto de bajo peso molecular compuesto únicamente por glucosa. Dado que el sEPS fue obtenido por precipitación alcohólica a partir del sobrenadante del medio de cultivo libre de células, se puede desestimar que la glucosa provenga de la crisolaminarina (Chiovitti *et al*. 2004).

En la fracción de mayor peso molecular se identificaron los mismos monosacáridos componentes para los sEPS de cultivos control y expuestos al metal, pero en los últimos, el producto reveló una mayor heterogeneidad. Esto sugiere una estructura más compleja del heteropolisacárido que podría estar relacionada con la inmovilización extracelular del metal. La confirmación de esta suposición requiere de estudios estructurales más detallados del polisacárido aislado, que exceden los objetivos de este trabajo.

Se han descripto diferentes heteropolisacáridos para los sEPS de diatomeas, los cuales pueden contener fucosa, ramnosa, manosa, glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa y/o ácidos glucurónico o galacturónico (Underwood y Paterson 2003; Delattre *et al*. 2016; Xiao y Zheng 2016), junto con algunos azúcares metilados, principalmente xilosa (Chiovitti *et al*. 2003; Daglio *et al*. 2017 en revisión).

En los biofilms bentónicos, los sEPS son rápidamente utilizados por los organismos heterótrofos como alimento (Underwood y Paterson 2003). Los polímeros u oligómeros de glucosa, manosa y xilosa se degradan a una velocidad mayor que aquellos que contienen fucosa, ramnosa y galactosa (Janse *et al*. 1999; Giroldo *et al*. 2003). Nótese que en los sEPS del control, la glucosa fue el monosacárido dominante mientras que en los cultivos expuestos al metal aumentaron notablemente los porcentajes de ramnosa y fucosa, lo que podría indicar una diferente tasa de degradación de ambos productos. Una tasa de degradación más lenta en presencia de metal podría afectar el reciclado de C-orgánico por los microorganismos del biofilm. El interés del estudio de los polímeros de las matrices de los biofilms tanto *in situ* como en cultivo se ha acrecentado con la utilización de técnicas especiales de espectrometría de masa con las que se busca encontrar “huellas digitales” de estas matrices de mucílago para relacionarlas con diferentes condiciones ambientales (Nicolau *et al*. 2014; Ai *et al*. 2015; Daglio *et al*. 2017 en revisión).

Finalmente, en relación a las hipótesis planteadas podemos concluir:

a) La exposición al metal no altera la tasa de crecimiento exponencial pero si el rendimiento final de biomasa. Con la exposición al metal fue mayor el contenido de proteínas y menor el de lípidos, especialmente en las células en la fase estacionaria. Por otro lado, la composición de los pigmentos fotosintéticos y la relación de clorofila *a/*pigmentos antena no se modificaron por la dicha exposición.
b) El estrés oxidativo impuesto por zinc fue evidenciado por una mayor actividad SOD en la etapa aguda de exposición. Otros indicadores como el daño de lípidos y la acumulación de compuestos fenólicos no sufrieron modificación importante.
c) Los frústulos de las células expuestas al metal presentaron una disminución de la relación superficie/ volumen, debido al aumento de menor magnitud de la superficie con respecto al volumen. Además mostraron una reducción en el tamaño de las areolas.
d) En la etapa aguda de exposición al zinc hubo un aumento significativo de la movilidad celular, tanto del porcentaje de individuos en movimiento como de su velocidad de desplazamiento. Dicha diferencia estuvo acompañada por una mayor secreción de mucílago extracelular en las células del tratamiento.
e) La composición de las fracciones de bajo peso molecular (sEPS) solubilizadas a partir del mucílago extracelular y aisladas a partir de los medios de cultivo libre de células revelaron una mayor heterogeneidad en los productos de los tratamientos.

De lo expuesto se concluye que estos resultados preliminares indican que la biomasa celular, la movilidad, la relación superficie/volumen de las células, el tamaño de las areolas y la cuantificación de la actividad SOD resultan buenos indicadores en bioensayos estáticos de toxicidad de zinc de 96 horas de duración utilizando la diatomea *Halamphora luciae*.

7. Abreviaturas

BHT: Butilen-hidroxitolueno

Chl: Cloroplasto

Chla: Clorofila a

CI50: Concentración Inhibitoria 50

EPS: Sustancias poliméricas extracelulares

MDA: Malondialdehido

MEB: Microscopía electrónica de barrido

PF: Peso fresco

SOD: Superóxidodismutasa

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARs: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TCA: Ácido tricloroacético

TFA: Ácido trifluoroácético

8. Agradecimientos

A la Dra. María Cecilia Rodríguez por su apoyo durante todo el trabajo en el laboratorio, su paciencia, sus ganas de trabajar, su comprensión. Gracias por hacerme crecer no solo como profesional sino también como persona.

A la Dra. María Cristina Matulewicz (Depto. de Química Orgánica, UBA y CIHIDECAR, CONICET) por permitirme trabajar en su laboratorio, por brindarme su ayuda y sus conocimientos.

A la Dra. Visitación Conforti y todo su equipo, por abrirme las puertas del laboratorio de Biología Comparada de Protistas.

A la Dra. Ángela Juárez, porque no solo fue una excelente docente, sino también me permitió formar parte de su equipo de trabajo de divulgación científica y siempre estar dispuesta a brindarme su ayuda.

A la Lic. Vanina Galzenati por ayudarme siempre que lo necesite.

A la Lic. Yasmín Daglio, quien estuvo presente en todo este recorrido, agradezco sus enseñanzas, por su ayuda constante y gracias por ser tan buena compañera.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por otorgarme una Beca Estímulo, por la calidad de docentes e investigadores que me inspiraron a amar esta carrera y sentir que la facultad es mi segunda casa.

A mi familia por el apoyo incondicional, por sobre todo a mis padres y mi hermano que han sido la clave de todos mis logros, por darme ánimos en momentos de flaquezas y por creer en mí.

A mis primas, Eli y Chiarita, porque siempre están presentes para alentarme, las adoro.

A mis amigas incondicionales, Lucia, Brenda, Vane y Yami, por nunca hacerme bajar los brazos, por siempre darme palabras de aliento y contagiarme de alegrías.

A mis amigos de la facu Yami, Javo, Juan y Gaby, agradezco tenerlos en mi vida, me hicieron crecer como persona y siempre estuvieron presentes para ayudarme tanto en las buenas como en las malas. A Julia, Jose, Tamy, Flor y Lau por siempre compartir momentos lindos, son hermosas personas. A todos mis compañeros de cursada que son muchos, por siempre recibirme con una sonrisa, sin ellos las cursadas y los laboratorios no hubieran sido lo mismo.

Gracias a todos por hacer esta tesis posible.

8. Bibliografía

Abdullahi A.S., Underwood G.J. & Gretz M.R. 2006. Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae). V. Environmental effects on polysaccharide synthesis in the model diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Phycology*, *42*(2), 363-378.

Adl S.M., Simpson A.G.B., Lane C.E., Lukeš J., Bass D., Bowser S.S., Brown M.W., Burki F., Dunthorn M., Hampl V., Heiss A., Hoppenrath M., Lara E., le Gall L., Lynn D.H., McManus H., Mitchell E.A.D., Mozley-Stanridge S.E., Parfrey L.W., Pawlowski J., Rueckert S., Shadwick L., Schoch C.L., Smirnov A. & Spiegel F.W. 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(5), 429-514.

Ai X.X., Liang J.R., GaoY.H., Lo S.C.L., Lee F.W.F., Chen C.P., Luo C.S. & Du C. 2015. MALDI-TOF MS analysis of the extracellular polysaccharides released by the diatom *Thalassiosira pseudonana* under various nutrient conditions. *Journal of Applied Phycology*, 27(2), 673-684.

Albersheim P., Nevins D. J., English P. D. & Karr A. 1967. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research*, *5*(3), 340-345.

Alipanah L., Rohloff J., Winge P., Bones A.M. & Brembu T. 2015. Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Experimental Botany*, 66(20), 6281-6296.

Andersen R. A. (Ed.). 2005. *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press, San Diego, California.

Apoya-horton M.D., Yin L., Underwood G.J.C. & Gretz M.R. 2006. Movement modalities and responses to environmental changes of the mudflat diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 42(2), 379-390.

Arkas M. & Tsiourvas D. 2009. Organic/inorganic hybrid nanospheres based on hyperbranched poly (ethylene imine) encapsulated into silica for the sorption of toxic metal ions and polycyclic aromatic hydrocarbons from water. *Journal of Hazardous Materials*, 170(1), 35-42.

Armbrust E.V., Berges J.A., Bowler C., Green B.R., Martinez D., Putnam N.H., Shiguo Z., Andrew E.A., Kirk E.A., Michael B., Mark A.B., Balbir K.C., Anthony C., Aubrey K.D., Mark S.D., Chris D., Tijana G., David G., Masood Z.H., Uffe H., Mark H., Bethany D.J., Jerzy J., Vladimir V.K., Nils K., Winnie W.Y.L., Todd W.L., Frank W.L., Casey L., Susan L., Mónica M., Anton M., Miroslav O., Micaela S.P., Brian P., Gregory J.P., Paul M.R., Tatiana A.R., Mak A.S., David C.S., Kimberlee T., Klaus V., Assaf V., Frances P.W., Daniel S.R. & Brzezinski M.A. 2004. The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science*, 306(5693), 79-86.

Barnech Bielsa G., Popovich C.A., Rodríguez M.C., Martínez A.M., Martín L., Matulewicz M.C. & Leonardi P.I. 2016. Simultaneous production assessment of triacylglicerols for biodiesel and exopolysaccharides as valuable co-products in *Navicula cincta*. *Algal Research*, 15,120-128.

Battarbee E.W. 1986. Diatom analysis. En: Handbook of Holocene Palaeoecology and Palaeohydrology . Berglund B.E. (editor), pp. 527–570. J. Wiley & Sons, New York.

Batzias A.F. & Siontorou C.G. 2008. A new scheme for biomonitoring heavy metal concentrations in semi-natural wetlands. *Journal of Hazardous Materials*, 158(2), 340-358.

Beauchamp C. & Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287.

Bellinger E.G. & Sigee D.C. 2010. Introduction to Freshwater Algae. En: Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators, pp.1-40. J. Wiley & Sons, New York.

Bertrand M. & Poirier I. 2005. Photosynthetic organisms and excess of metals. *Photosynthetica*, 43(3), 345-353.

Blaby-Haas C.E. & Merchant S.S. 2012. The ins and outs of algal metal transport. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Research*, 1823(9), 1531-1552.

Bliss C.I. 1934. The method of probits. *Science*, *79*(2037), 38-39.

Bowler C., Allen A.E., Badger J.H., Grimwood J., Jabbari K., Kuo A., Maheswari U., Martens C., Maumus F., Otillar R.P., Rayko E., Salamov A., Vandepoele K., Beszteri B., Gruber A., Heijde M., Katinka M., Mock T., Valentin K., Verret F., Berges J.A., Brownlee C., Cadoret J.P., Chiovitti A., Choi C.J., Coesel S., De Martino A., Detter J.C., Durkin C., Falciatore A., Fournet J., Haruta M., Huysman M.J., Jenkins B.D., Jiroutova K., Jorgensen R.E., Joubert Y., Kaplan A., Kröger N., Kroth P.G., La Roche J., Lindquist E., Lommer M., Martin-Jézéquel V., Lopez P.J., Lucas S., Mangogna M., McGinnis K., Medlin L.K., Montsant A., Oudot-Le Secq M.P., Napoli C., Obornik M., Parker M.S., Petit J.L., Porcel B.M., Poulsen N., Robison M., Rychlewski L., Rynearson T.A., Schmutz J., Shapiro H., Siaut M., Stanley M., Sussman M.R., Taylor A.R., Vardi A., von Dassow P., Vyverman W., Willis A., Wyrwicz L.S., Rokhsar D.S., Weissenbach J., Armbrust E.V., Green B.R., Van de Peer Y. & Grigoriev I.V. 2008. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, 456(7219), 239-244.

Bozarth A., Maier U.G. & Zauner S. 2009. Diatoms in biotechnology: modern tools and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(2), 195-201.

Brembu T., Jørstad M., Winge P., Valle K.C. & Bones A.M. 2011. Genome-wide profiling of responses to cadmium in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Environmental Science & technology*, 45(18), 7640-7647.

Briner J.P., Miller G.H., Davis P.T. & Finkel R.C. 2006. Cosmogenic radionuclides from fiord landscapes support differential erosion by overriding ice sheets. *Geological Society of America Bulletin*, 118(3-4), 406-420.

Cattaneo A., Couillard Y., Wunsam S. & Courcelles M. 2004. Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in Lac Dufault (Québec, Canada). *Journal of Paleolimnology*, 32(2), 163-175.

Chiovitti A., Bacic A., Burke J. & Wetherbee R. 2003. Heterogeneous xylose-rich glycans are associated with extracellular glycoproteins from the biofouling diatom *Craspedostauros australis* (Bacillariophyceae). *European Journal of Phycology*, 38(4), 351-360.

Chiovitti A., Molino P., Crawford S.A., Teng R., Spurck T. & Wetherbee R. 2004. The glucans extracted with warm water from diatoms are mainly derived from intracellular chrysolaminaran and not extracellular polysaccharides. *European Journal of Phycology*, 39(2), 117-128.

Cohn S.A., Farrell J.F., Munro J.D., Ragland R.L., Weitzell Jr R.E. & Wibisono B.L. 2003. The effect of temperature and mixed species composition on diatom motility and adhesion. *Diatom Research*, 18(2), 225-243.

Cohn S.A., Bahena M., Davis J., Ragland R., Rauschenberg C. & Smith B. 2004. Characterisation of the diatom photophobic response to high irradiance. *Diatom Research*, 19(2), 167-179.

Cooksey B. & Cooksey K.E. 1988. Chemical signal-response in diatoms of the genus *Amphora*. *Journal of Cell Science*, 91, 523-529.

Coquillé N., Jan G., Moreira A. & Morin S. 2015. Use of diatom motility features as endpoints of metolachlor toxicity. *Aquatic Toxicology*, 158, 202-210.

Cox E.H., McLendon G.L., Morel F.M., Lane T.W., Prince R.C., Pickering I.J. & George G.N. 2000. The active site structure of *Thalassiosira weissflogii* carbonic anhydrase. *Biochemistry*, 39(40), 12128-12130.

Cox E.J. 2006. Raphe loss and spine formation in *Diadesmis gallica* (Bacillariophyta)-an intriguing example of phenotypic polymorphism in a diatom. *Nova Hedwigia Beiheft*, 130, 163.

Daglio Y., Maidana N.I., Matulewicz M.C. & Rodríguez M.C. 2016. Changes in motility and induction of enzymatic activity by nitrogen and phosphate deficiency in benthic *Halamphora luciae* (Bacillariophyceae) from Argentina. *Phycologia*, 55(5), 493-505.

Daglio Y., Salum M.L., Rodríguez M.C., Erra-Balsells R. & Matulewicz M.C. 2017. Incidence of culture age and nutrient status on cells and extracellular polymeric substances in the diatom *Halamphora luciae*. En revisión *Journal of Applied Phycology.*

Decho A.W. 2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research*, 20(10), 1257-1273.

De La Rocha C.L., Hutchins D.A., Brzezinski M.A. & Zhang Y. 2000. Effects of iron and zinc deficiency on elemental composition and silica production by diatoms. *Marine Ecology Progress Series*, 195, 71-79.

Delattre C., Pierre G., Laroche C. & Michaud P. 2016. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1159-1179.

Dickman M.D. 1998. Benthic marine diatom deformities associated with contaminated sediments in Hong Kong. *Environment international*, 24(7), 749-759.

Di Rienzo J.A., Casanoves F.,Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. & Robledo C.W. 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. http://www.infostat.com.ar

DuBois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.T. & Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.

Duval B., Shetty K. & Thomas W. 2000. Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *Journal of Applied Phycology*, 11(6), 559-566.

Ezequiel J., Laviale M., Frankenbach S., Cartaxana P. & Serôdio J. 2015. Photoacclimation state determines the photobehaviour of motile microalgae: the case of a benthic diatom. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 468, 11-20.

Falasco E., Bona F., Ginepro M., Badino G., Hoffmann L. & Ector L. 2009. Diatom teratological forms and environmental alterations: a review. *Hydrobiologia,* 623, 1–35.

Falkowski P.G., Barber R.T. & Smetacek V. 1998. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*, 281(5374), 200-206.

Falkowski P.G., Katz M.E., Knoll A.H., Quigg A., Raven J.A., Schofield O. & Taylor F.J.R. 2004. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science*, 305(5682), 354-360.

Ferrer L.D., Santiago Andrade J., Contardi E.T., Asteasuain R.O. & Marcovecchio J.E. 2003. Copper and zinc concentrations in Bahía Blanca Estuary (Argentina), and their acute lethal effects on larvae of the crab *Chasmagnathus granulata*. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 15(1), 7-14.

Franklin N.M., Stauber J.L., Apte S.C. & Lim R.P. 2002. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(4), 742-751.

Gagneux-Moreaux S., Cosson R.P., Bustamante P. & Moreau C. 2006. Growth and metal uptake of microalgae produced using salt groundwaters from the Bay of Bourgneuf. *Aquatic Living Resources*, 19(3), 247-255.

Gillan F.T., Fisher N.S. & Johns R.B. 1983. The Effects of Copper and Zinc on the Fatty Acids and Carotenoids in the Marine Diatom *Asterionella japonica*. *Botanica Marina*, *26*(5), 255-257.

Girling A.E., Pascoe D., Janssen C.R., Peither A., Wenzel A., Schafer H., Neumeir B., Mitchell G.C., Taylor E.1., Maund S.L., Lay J.P., Jiittner L., Crossland N.O., Stephenson, R.R. & Persoone G. 2000. Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *45*(2), 148-176.

Giroldo D., Vieira A.A.H. & Paulsen B.S. 2003. Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by a tropical freshwater *Thalassiosira* sp. (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, *39*(6), 1109-1115.

Gold C., Feurtet-Mazel A., Coste M. & Boudou A. 2003. Impacts of Cd and Zn on the development of periphytic diatom communities in artificial streams located along a river pollution gradient. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44(2), 189-197.

Gómez N. & Licursi M. 2001. The Pampean Diatom Index (IDP) for assessment of rivers and streams in Argentina. *Aquatic Ecology*, *35*(2), 173-181.

Graham L., Graham J. & Wilcox L. 2010. Algae, 2ed. Benjamin Cummnings (Pearson), San Francisco, CA., USA.

Granum E. & Myklestad S.M. 2001. Mobilization of β-1, 3-glucan and biosynthesis of amino acids induced by NH^{4+} addition to N-limited cells of the marine diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, *37*(5), 772-782.

Gupta S. & Agrawal S.C. 2007. Survival and Motility of diatoms *Navicula grimmei* and *Nitzschia palea* affected by some physical and chemical factors. *Folia Microbiologica*, *52*(2), 127-134.

Hasle G.R. & Syvertsen E .E. 1997. Marine diatoms, p 5–385. *Identifying Marine Phytoplankton. Academic Press, San Diego, CA*.

Hedenborg A. 2016. Zinc tolerance of freshwater diatoms isolated from sites with zinc pollution; and pH effect on zinc toxicity. *MSc Thesis*. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.

Higgins M.J., Molino P., Mulvaney P. & Wetherbee R. 2003. The structure and nanomechanical properties of the adhesive mucilage that mediates diatom-substratum adhesion and motility. *Journal of Phycology*, *39*(6), 1181-1193.

Hodges D.M., Delong J.M., Forney C.F. & Prange R.K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, *207*(4), 604-611.

Horvatic J. & Persic V. 2007. The effect of Ni^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+} and Hg^{2+} on the growth rate of marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin: Microplate growth inhibition test. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *79*(5), 494-498.

Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M. & Darzins A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, *54*(4), 621-639.

Ivorra N., Bremer S., Guasch H., Kraak M. H. & Admiraal W. 2000. Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(5), 1332-1339.

Janse I., van Rijssel M., Ottema A. & Gottschal J.C. 1999. Microbial breakdown of *Phaeocystis* mucopolysaccharides. *Limnology and Oceanography*, *44*(6), 1447-1457.

Katz M.E., Wright J.D., Miller K.G., Cramer B.S., Fennel K. & Falkowski P.G. 2005. Biological overprint of the geological carbon cycle. *Marine Geology*, *217*(3), 323-338.

Küpper H., Küpper F.C. & Spiller M. 1998. In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. *Photosynthesis Research*, 58(2), 123-133.

Küpper H., Setlík I., Spiller M., Küpper F.C. & Prásil O. 2002. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. *Journal of Phycology*, *38*(3), 429-441.

Levitan O., Dinamarca J., Zelzion E., Lun D., Guerra L.T., Kim M.K., Kim J., Van mooy B.A.S., Bhattacharya D. & Falkowski P. 2015. Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(2), 412-417.

Levkov Z. 2009. *Amphora sensu lato*. In: Diatoms of Europe: diatoms of the European inland waters and comparable habitats, vol. 5 (Ed. by H. Lange-Bertalot). A.R. Gantner Verlag, Ruggell, Liechtenstein. 916 pp.

Lotter A.F., Pienitz R. & Schmidt R. 1999. Diatoms as indicators of environmental change near arctic and alpine treeline. *The Diatoms: Applications to the Environmental and Earth Sciences, 205-226.*

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265-275.

Markina Z.V. & Aizdaicher N.A. 2006. Content of photosynthetic pigments, growth, and cell size of microalga *Phaeodactylum tricornutum* in the copper-polluted environment. *Russian Journal of Plant Physiology*, *53*(3), 305-309.

Masmoudi S., Nguyen-Deroche N., Caruso A., Ayadi H., Morant-Manceau A., Tremblin G. & Schoefs B. 2013. Cadmium, copper, sodium and zinc effects on diatoms: From heaven to hell—A review. *Cryptogamie, Algologie*, *34*(2), 185-225.

McLachlan D.H., Brownlee C., Taylor A.R., Geider R.J. & Underwood G.J. 2009. Light-induced motile responses of the estuarine benthic diatoms *Navicula perminuta* and *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, *45*(3), 592-599.

Medlin L.K. 2017. Evolution of the diatoms: IX. Two datasets resolving monophyletic Classes of diatoms are used to explore the validity of adding short clone library sequences to the analysis. *European Journal Of Phycology* , 52(1), 90-103

Melis A. 1991. Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, *1058*(2), 87-106.

Miao A.J., Wang W.X. & Juneau P. 2005. Comparison of Cd, Cu, and Zn toxic effects on four marine phytoplankton by pulse amplitude-modulated fluorometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *24*(10), 2603-2611.

Mitbavkar S. & Anil A.C. 2004. Vertical migratory rhythms of benthic diatoms in a tropical intertidal sand flat: influence of irradiance and tides. *Marine Biology*, *145*(1), 9-20.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, *7*(9), 405-410.

Molino P.J. & Wetherbee R. 2008. The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes. *Biofouling*, *24*(5), 365-379.

Monteiro C. M., Fonseca S. C., Castro P. M. & Malcata F. X. 2011. Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal. *Journal of Applied Phycology*, *23*(1), 97-103.

Morel F.M.M., Hudson R.J. & Price N.M. 1991. Limitation of productivity by trace metals in the sea. *Limnology and Oceanography*, *36*(8), 1742-1755.

Morel F.M.M., Reinfelder J.R., Roberts S.B., Chamberlain C.P., Lee J.G. & Yee D. 1994. Zinc and carbon co-limitation of marine phytoplankton. *Nature*, *369*(6483), 740-742.

Morelli E. & Scarano, G. 2004. Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Science*, *167*(2), 289-296.

Morin S., Corcoll N., Bonet B., Tlili A. & Guasch H. 2014. Diatom responses to zinc contamination along a Mediterranean river. *Plant Ecology and Evolution*, *147*(3), 325-332.

Morin S., Cordonier A., Lavoie I., Arini A., Blanco S., Duong T.T., Tornés E., Bonet B., Corcoll N., Faggiano L., Péres F., Becares E., Coste M., Feurtet-Mazel A., Fortin C., Guasch H., Sabater S. & Laviale M. 2012. Consistency in diatom response to metal-contaminated environments. En *Emerging and priority pollutants in rivers* (pp. 117-146). Springer Berlin Heidelberg.

Murugan K. & Harish S.R. 2007. Antioxidant modulation in response to heavy metal induced oxidative stress in *Cladophora glomerata*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45: 980-983.

Nguyen-Deroche T.L.N., Caruso A., Le T.T., Bui T.V., Schoefs B., Tremblin G. & Morant-Manceau A. 2012. Zinc affects differently growth, photosynthesis, antioxidant, enzyme activities and phytochelatin synthase expression of four marine diatoms. *The Scientific World Journal*, 2012, 15.

Nicolau A., Santos L., Santos C. & Mota M. 2014. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applied to diatom identification: influence of culturing age. *Aquatic Biology*, *20*(2), 139-144.

Oldfield F. 2005. Introduction: the Holocene, a special time. En Mackay A., Battarbee R.W., Briks H.J.B. & Oldfield F. (eds.), Global Change in the Holocene. Arnold, London, 1-8.

Pagenkopf G.K. 1986. Metal Ion Speciation and Toxicity in Aquatic Systems. En H. Sigel (ed.), Metal Ions in Biological Systems, Vol 20, Marcel Dekker Inc, New York, 101-118.

Pandey L.K. & Bergey E.A. 2016. Exploring the status of motility, lipid bodies, deformities and size reduction in periphytic diatom community from chronically metal (Cu, Zn) polluted waterbodies as a biomonitoring tool. *Science of the Total Environment*, *550*, 372-381.

Pinto E., Sigaud-kutner T.C.S., Leitao M.A.S., Okamoto O.K., Morse D. & Colepicolo P. 2003. Heavy metal–induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*, *39*(6), 1008-1018.

Popovich C.A., Damiani C., Constenla D. & Leonardi P.I. 2012. Lipid quality of the diatoms *Skeletonema costatum* and *Navicula gregaria* from the South Atlantic Coast (Argentina): evaluation of its suitability as biodiesel feedstock. *Journal of Applied Phycology*, *24*(1), 1-10.

Pulz O. & Gross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*(6), 635-648.

Raven J.A. 1984. A cost-benefit analysis of photon absorption by photosynthetic unicells. *New Phytologist*, *98*(4), 593-625.

Raven J.A. & Kübler J.E. 2002. New light on the scaling of metabolic rate with the size of algae. *Journal of Phycology*, 38(1), 11-16.

Rayko E., Maumus F., Maheswari U., Jabbari K. & Bowler C. 2010. Transcription factor families inferred from genome sequences of photosynthetic stramenopiles. *New Phytologist*, *188*(1), 52-66.

Riechmann J. L. & Ratcliffe O. J. 2000. A genomic perspective on plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*, *3*(5), 423-434.

Rijstenbil J.W., Derksen J.W.M., Gerringa L.J.A., Poortvliet T.C.W., Sandee A., Berg M.V.D. & Wijnholds, J. A. 1994a. Oxidative stress induced by copper: defense and damage in the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*, grown in continuous cultures with high and low zinc levels. *Marine Biology*, *119*(4), 583-590.

Rijstenbil J.W., Sandee A., Van Drie J. & Wijnholds J.A. 1994b. Interaction of toxic trace metals and mechanisms of detoxification in the planktonic diatoms *Ditylum brightwellii* and *Thalassiosira pseudonana*. *FEMS Microbiology Reviews*, *14*(4), 387-396.

Rocchetta I. & Küpper H. 2009. Chromium- and copper-induced inhibition of photosynthesis in *Euglena gracilis* analysed on the single-cell level by fluorescence kinetic microscopy. *New Phytologist*, *182*(2), 405-420.

Rodríguez M.C., Rocchetta I., Juárez A.B., Tolivia A. & Conforti V. 2008. Toxicidad de los metales pesados sobre las microalgas: efectos bioquímicos, fisiológicos y morfológicos. En "Efecto de los cambios globales sobre biodiversidad". Rial A., Volpedo A., Fernández Reyes L. (editores). CYTED. Buenos Aires, pp. 259-278.

Rühland K., Priesnitz A. & Smol J.P. 2003. Paleolimnological evidence from diatoms for recent environmental changes in 50 lakes across Canadian Arctic treeline. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, *35*(1), 110-123.

Saburova M.A. & Polikarpov I.G. 2003. Diatom activity within soft sediments: behavioural and physiological processes. *Marine Ecology Progress Series*, *251*, 115-126.

Sarthou G., Timmermans K.R., Blain S. & Tréguer P. 2005. Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *Journal of Sea Research*, *53*(1), 25-42.

Sbihi K., Cherifi O. & Bertrand M. 2012. Toxicity and biosorption of chromium from aqueous solutions by the diatom *Planothidium lanceolatum* (Brébisson) Lange-Bertalot. *American Journal of Scientific and Industrial Research*, *3*(1), 27-38.

Serra M.N., García M.L., Maidana N.I., Villarosa G., Lami A. & Massaferro J. 2016. Little Ice Age to present paleoenvironmental reconstruction based on multiproxy analyses from Nahuel Huapi Lake (Patagonia, Argentina). *Ameghiniana,* 53: 58–73.

Smith D.J. & Underwood G.J. 1998. Exopolymer production by intertidal epipelic diatoms. *Limnology and Oceanography*, *43*(7), 1578-1591.

Souza Machado A.A., Goncalvez-Araujo R.,Teixeira P.F., Tavano V.M. & Bianchini A. 2014. Effects of zinc on in vivo fluorescence, chlorophyll *a* and growth of the diatom *Conticribra weissflogii* (Thalassiosirales, Thalassiosiraceae). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, *9*(4), 278-287.

Steemann Nielsen E. & Kamp-Nielsen L. 1970. Influence of deleterious concentrations of copper on the growth of Chlorella pyrenoidosa. *Physiologia Plantarum*, *23*(4), 828-840.

Sterman N. T. 1988. Spectrophotometric and fluorometric chlorophyll analysis. En Lobban C.S., Chapman D.J. & Kremer B.P. (eds) Experimental Phycology. A Laboratory Manual. Cambridge Univ Press, Cambridge, 35-46

Størseth T.R., Kirkvold S., Skjermo J. & Reitan K.I. 2006. A branched β-D-(1→ 3, 1→ 6)-glucan from the marine diatom *Chaetoceros debilis* (Bacillariophyceae) characterized by NMR. *Carbohydrate Research*, *341*(12), 2108-2114.

Strickland J.D. & Parsons T.R. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada Bulletin. 167, 185-199.

Sun J. & Liu D. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, *25*(11), 1331-1346.

Theriot E.C., Ashworth M., Ruck E., Nakov T. & Jansen R.K. 2010. A preliminary multigene phylogeny of the diatoms (Bacillariophyta): challenges for future research. *Plant Ecology and Evolution*, *143*(3), 278-296.

Torres E., Cid A., Fidalgo P., Herrero C. & Abalde J. 1997. Long-chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Aquatic Toxicology*, *39*(3), 231-246.

Treguer P., Nelson D.M., Van Bennekom A.J. & DeMaster D .J. 1995. The silica balance in the world ocean: a reestimate. *Science*, *268*(5209), 375.

Underwood G.J.C. & Paterson D. 2003. The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipelic diatoms. *Advances in Botanical Research*, *40*, 183-240.

Vavilin D.V., Ducruet J.M., Matorin D.N., Venediktov P.S. & Rubin A.B. 1998. Membrane lipid peroxidation, cell viability and photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *42*(3), 233-239.

Witkowski A., Brehm U., Palinska K. & Rhiel E. 2012. Swarmlike migratory behaviour in the laboratory of a pennate diatom isolated from North Sea sediments. *Diatom Research*, *27*(2), 95-100.

Wood A.M., Everroad R.C. & Wingard L.M. 2005. 18. Measuring growth rates in microalgal cultures. En: Algal culturing techniques . Andersen R.A. (editor), pp. 269–286. Elsevier Academic Press, San Diego, California.

Xiao R. & Zheng Y. 2016. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology Advances*, *34*(7), 1225-1244.

Índice

1. *Introducción* 1
2. *Objetivos* 9
3. *Hipótesis* 10
4. *Materiales y Métodos* 11
   - *4.1. Origen de la cepa estudiada* 11
   - *4.2. Cultivo y mantenimiento de la cepa* 11
   - *4.3. Bioensayos* 12
     - *4.3.1. Determinación de la concentración Inhibitoria 50 (CI50)* 12
     - *4.3.2. Determinación de los puntos finales de los bioensayos* 13
     - *4.3.3. Bioensayos de movilidad* 14
   - *4.4. Morfología y morfometría de los frústulos* 14
     - *4.4.1. Observación de las células al microscopio óptico* 14
     - *4.4.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB)* 15
     - *4.4.3. Observación del mucílago al microscopio óptico* 16
   - *4.5. Métodos analíticos* 16
     - *4.5.1. Determinación de los hidratos de carbono totales* 16
     - *4.5.2. Determinación de las proteínas totales* 16
     - *4.5.3. Determinación de la composición de los pigmentos fotosintéticos* 16
     - *4.5.4. Determinación sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARs)* 17
     - *4.5.5. Determinación de compuestos fenólicos* 18
   - *4.6. Medición de la actividad de superóxido dismutasa (SOD)* 18
     - *4.6.1. Obtención de homogenatos celulares* 18
     - *4.6.2. Medición de la actividad SOD* 18
   - *4.7. Sustancias poliméricas extracelulares solubles en el medio de cultivo* 20
     - *4.7.1. Obtención* 20
     - *4.7.2. Desalado por cromatografía de permeación en geles* 20
     - *4.7.3. Hidrólisis ácida y obtención de los alditoles peracetillados* 20
     - *4.7.4. Cromatografía gas-líquido* 21
   - *4.8. Análisis estadísticos de los resultados* 21
5. *Resultados* 22
   - *5.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 (CI50)* 22
   - *5.2. Determinación de los puntos finales de los bioensayos* 24
   - *5.3. Morfología y Morfometría de los frústulos* 24

5.3.1. Observación de la células al microscopio óptico 24
5.3.2. Características ultraestructurales de los frústulos 26
5.3.3. Morfometría de los frústulos y relación superficie/volumen 29
5.4. Ensayos de movilidad 30
5.5. Medición de variables seleccionadas en los bioensayos 34
5.5.1. Cuantificación de las proteínas totales 34
5.5.2. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos 34
5.5.3. Determinación sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARs) 36
5.5.4. Determinación de compuestos fenólicos 36
5.5.5. Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) 37
5.5.6. Estimación de la concentración de hidratos de carbono en los sEPS 38
5.5.6.1. Caracterización preliminar de sustancias poliméricas extracelulares solubles en el medio de cultivo 39
6. Discusión 41
7. Abreviaturas 51
8. Agradecimientos 52
9. Bibliografía 53