

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

“Evaluación de NADPH citocromo P450 reductasa en la microalga *Dunaliella tertiolecta* en presencia de benzo[a]pireno”

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA:

ALETHIA MARGARITA ROJAS LEAL

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

SEPTIEMBRE DEL 2010

TESIS DEFENDIDA POR
ALETHIA MARGARITA ROJAS LEAL

APROBADA POR EL COMITÉ

Dra. Graciela Guerra Rivas
Directora de Tesis

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Sinodal

M.C. Sergio Raúl Canino Herrera
Sinodal

RESUMEN

Uno de los atractivos para la explotación de microalgas radica en su capacidad de remover materia inorgánica del medio. Además de esta característica, algunas microalgas han sido reportadas como organismos capaces de biotransformar y biodegradar compuestos derivados del petróleo, organoclorados y pesticidas, razón por la que el género *Dunaliella* tienen gran potencial en la remoción de contaminantes ambientales. En zonas contaminadas, *Dunaliella* ha mostrado tolerancia a los combustibles y es única en sus capacidades de adaptación ante estos compuestos. En este estudio se evaluó la actividad de la enzima NADPH citocromo P450 reductasa en la microalga *D. tertiolecta* expuesta al hidrocarburo policíclico aromático benzo[a]pireno (BaP). Se realizaron ensayos de exposición a dos concentraciones de BaP, 1.3 y 3.8 $\mu\text{g/L}$ a diversos tiempos (2 a 27 horas), considerándose grupos control (microalgas suspendidas en agua de mar) y control solvente (microalgas expuestas a acetonitrilo). La concentración de 1.3 $\mu\text{g/L}$ de BaP no mostró efectos en la actividad enzimática de NADPH cit P450 reductasa en la microalga *D. tertiolecta*, mientras que a la concentración de 3.8 $\mu\text{g/L}$ de BaP sí se observaron efectos, los cuales se presentaron entre las 6 y 9 h de exposición al BaP. El incremento en la actividad enzimática observado a las 6 h sugiere que esta enzima forma parte inicial del metabolismo de BaP, mientras que la inhibición observada a las 9 h permite suponer la presencia de inhibidores del metabolismo del BaP. A partir de las 12 h, la actividad enzimática de NADPH cit P450 reductasa se estabilizó, atribuyendo esta disminución en la respuesta de NADPH cit P450 reductasa a un posible metabolismo de BaP mediante vías metabólicas alternas a esta enzima.

A Renata Noé

Porque en todo momento me asombras, me inquietas y te admiro... me demuestras que ser tan independiente eres y que aparte de ser mi hija pasas a ser una persona curiosa, aprendiz y que emprende su camino por la vida...

Porque me has permitido sobrepasar límites en el amor, el esfuerzo, la paciencia... Porque desde que llegaste te convertiste en la mejor aventura de mi vida; comenzaste siendo mi más preciada gota y espero seguir abriendo tu cauce para verte correr y llegar a ser el más hermoso de mis océanos.

A Raúl

Porque me has dado tanto amor, tanta fuerza... vamos juntos en este barco que se llama vida y aunque a momentos soltemos el timón, nuestro rumbo no cambia ni se pierde... al momento de saber que eres cómplice de mi vida, el complemento a mi ser, nuestro rumbo quedó fijo... por todo lo que eres, por ser el amor de mi vida, gracias.

A Emma, mi mamá

Que mejor guía y apoyo que de aquella mujer de lucha incansable, de ayuda ciega y gran corazón. Por ser mi puerto en toda costa a la que voy... a mi mujer electricista, pero sobre todo a mi madre que todo lo ha dado, gracias, te amo.

A mí alrededor

Por contener elementos esenciales para mi vida, permanentes y momentáneos; por toparme con aquellos que dificultan pero permiten aprender y apreciar lo verdaderamente maravilloso de esta vida

Agradecimientos

A la Dra. Graciela Guerra Rivas, por dar paso a este trabajo y hacerlo posible, por la paciencia y dedicación al mismo. A momentos fue difícil distinguir la enseñanza de la plática, el regaño del consejo, pero sobretodo a la maestra de una amiga.

A la Dra. Beatriz Cordero Esquivel, por tan amena y reconfortante enseñanza. Por su inquietud y aliciente a este trabajo, pero sobretodo por la calidez humana y científica.

Al M.C. Sergio Raúl Canino Herrera, por la enseñanza y rumbo plasmado en mi formación profesional. Por su aportación a la mejora de este trabajo.

Al equipo de Farmacología y Toxicología Marina. A Isajav, Cynthia, Claudia, Mily y Yulizeth por la ayuda en el desempeño en laboratorio pero sobretodo por las platicas y momentos que hicieron de esta y respectivas investigaciones un segundo hogar.

A la Facultad de Ciencias Marinas y al Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California, por la oportunidad, apoyo y educación.

A CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

CONTENIDO

1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	7
3. HIPOTESIS	11
4. OBJETIVO	11
5. METODOLOGIA	12
5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	12
5.2. EXPERIMENTACION PREVIA	12
5.2.1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE MICROALGAS	12
5.2.2. DETERMINACIÓN DE CONDICIONES DE EXPERIMENTACIÓN	13
5.2.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	15
5.3. EXPOSICIÓN DE LA MICROALGA <i>Dunaliella Tertiolecta</i> A BENZO[a]PIRENO.....	15
5.3.1. ENSAYO DE EXPOSICIÓN DE <i>Dunaliella Tertiolecta</i> A BENZO[a]PIRENO.....	15
5.3.2. OBTENCIÓN DEL PAQUETE CELULAR	17
5.3.3. ENSAYO PARA NADPH CITOCROMO P450 REDUCTASA	17
5.4. ANALISIS ESTADISTICO	18
6. RESULTADOS	19
6.1. EXPERIMENTACION PREVIA	19
6.1.1. DETERMINACIÓN DE CONDICIONES DE EXPERIMENTACIÓN	19
6.1.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	22
6.2. EXPOSICIÓN DE LA MICROALGA <i>Dunaliella tertiolecta</i> A 1.3 µg/L DE BENZO[a]PIRENO.....	23
6.3. EXPOSICIÓN DE LA MICROALGA <i>Dunaliella tertiolecta</i> A 3.8 µg/L DE BENZO[a]PIRENO.....	24
7. DISCUSIÓN	26
8. CONCLUSIONES	33
9. BIBLIOGRAFIA	34

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Cultivo de la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> en el Laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina, UABC.	13
2	Sistema de exposición de <i>Dunaliella tertiolecta</i> a benzo[a]pireno.	17
3	Actividad enzimática de NADPH cit P450 reductasa en función de la densidad celular de la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> .	21
4	Valores del cambio en la absorbancia conforme el tiempo ($\Delta A/\text{min}$) en el ensayo enzimático, para cada densidad celular.	22
5	Valores del cambio en la absorbancia conforme el tiempo (DA/min) en el ensayo enzimático en relación a la cantidad de proteína presente.	22
6	Relación de la cantidad de proteína según la densidad celular de la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> en fase exponencial.	23

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Evaluación preliminar del efecto de la centrifugación en la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> .	20
II	Evaluación definitiva del efecto de la centrifugación a 3000 rpm en la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> .	20
III	Actividad enzimática de NADPH citocromo P450 reductasa de la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> expuesta a 1.3 µg/L de benzo[a]pireno en un intervalo de tiempo.	24
IV	Actividad enzimática de NADPH citocromo P450 reductasa de la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> expuesta a 3.8 µg/L de benzo[a]pireno en un intervalo de tiempo.	26

1. INTRODUCCION

El desequilibrio en los ecosistemas está dado principalmente por la presencia de compuestos tóxicos, en concentraciones y tiempos de residencia que afectan la calidad y composición del ecosistema y todo lo que lo integra. Estos compuestos tóxicos, denominados también xenobióticos, son ajenos a los diferentes ecosistemas en los que se encuentran y surgen en gran medida a partir de la síntesis química, como producto de la actividad antropogénica.

Dentro de los compuestos altamente tóxicos y de mayor interés en el medio acuático se encuentran los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA's) (Leaver, 1996). Los HPA's son compuestos orgánicos hidrofóbicos de dos o más anillos bencénicos (CEPA, 1994). Pueden ser introducidos al medio de forma natural (erupciones volcánicas, incendios forestales) pero también son producidos por la actividad antropogénica, siendo las mayores fuentes de contaminación al ambiente por HPA's el uso de carbón, la destilación de la madera, el uso industrial de gas y refinerías, las aguas de arrastre del pavimento asfáltico, las emisiones vehiculares, los derrames de petróleo y la combustión incompleta de combustibles fósiles y materia orgánica (Canet *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2005). En el grupo de los HPA's se encuentran derivados del petróleo como el benzo[a]pireno (BaP), pireno, fenantreno, naftaleno y fluoranteno, todos ellos productos de la combustión incompleta de hidrocarburos (Leaver, 1996). La contaminación por estos compuestos ha atraído el interés público y académico debido a que algunos de ellos se sabe o sospecha que son mutagénicos y/o carcinogénicos.

El precio de recuperar los ecosistemas contaminados es incalculable. Es por ello que los gobiernos, la industria y la sociedad han reconocido la necesidad de utilizar alternativas más económicas y de menor impacto en comparación a los métodos tradicionales físico químicos comúnmente empleados. Estas alternativas tienen como principal sustento a la biodegradación, proceso natural por el cual las bacterias u otros organismos vivos transforman, en su totalidad o parcialmente, a los compuestos xenobióticos en otras sustancias menos tóxicas. La aplicación de este proceso como técnica de descontaminación de ecosistemas se le denomina biorremediación, refiriéndose a la transformación química de los contaminantes mediante el uso de microorganismos que satisfacen sus requerimientos nutrimentales y de energía contribuyendo así a la desintoxicación del ambiente por mineralización o co-metabolismo (US EPA, 1996). La biorremediación, a diferencia del tratamiento biológico en el cual se busca eliminar a los compuestos contaminantes inmediatamente después de ser generados y previo a su impacto en cuerpos receptores, tiene como finalidad el solucionar los deterioros ambientales originados a partir de una fuente, aislada o continua, del contaminante. Es por eso que actualmente constituye una de las metodologías en expansión, considerándose como una tecnología muy competitiva, ya que puede ser de bajo costo de instalación y operación, fácil aplicación, con productos generalmente inocuos y sobre todo con mínimos riesgos a la salud humana y ambiental (Castillo *et al.*, 2005; Viñas *et al.*, 2001). Cabe mencionar que esta técnica, además de utilizar microorganismos tales como bacterias, hongos, levaduras y microalgas, también hace uso de enzimas y células inmovilizadas que remueven contaminantes del ambiente. Para que el proceso de biorremediación en un ecosistema sea efectivo, es necesaria la detección del xenobiótico en el medio y posteriormente la evaluación de los efectos que tenga en los organismos de la zona. Una alternativa para evaluar dichos efectos es el uso de biomarcadores, los cuales pueden definirse como la evaluación de

las respuestas y/o alteraciones bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e histopatológicas, ocasionadas por la exposición a contaminantes (US NRC, 1989). Dentro de las respuestas y/o alteraciones evaluadas se incluyen cambios en la expresión genética, alteraciones en el contenido de proteína así como en la actividad enzimática entre otras (Bucheli *et al.*, 1995., Hahn *et al.*, 1999). Algunos de los biomarcadores mas estudiados están relacionados con la respuesta enzimática asociada al proceso de biotransformación de los xenobióticos como los HPA's y entre éstos se encuentra el citocromo P450 (Cyt P450), la etoxiresorufin-O-deetilasa (EROD), el glutatión (GSH), las metalotioneinas, colinesterasas y transaminasas (Collier *et al.*, 1995; Eggens *et al.*, 1996).

La biotransformación consta de dos fases para el metabolismo de los compuestos xenobióticos, misma que puede ser modulada significativamente por factores tales como temperatura, condición fisiológica y estado nutricional/reproductivo del organismo (Collier *et al.*, 1995; Eggens *et al.*, 1996). La primera fase implica la activación del sustrato a través de procesos de oxidación, reducción e hidrólisis, mediante los cuales se introducen o modifican grupos funcionales del xenobiótico con el fin de conferirle polaridad; en la segunda fase otro grupo de enzimas agrega grupos polares al derivado (Leahy *et al.*, 1990; Maier *et al.*, 2000; Gómez-Gutiérrez, 2004). En la primera fase, la mayoría de las sustancias químicas son catalizadas por las oxidasas de función mixta (MFO por sus siglas en ingles, mixed function oxidase), en conjunto con el Cyt P450 (Botello, 2005). El Cyt P450 es el principal responsable de la biotransformación de hidrocarburos aromáticos y clorados (Livingstone, 1993). El Cyt P450 es un sistema multienzimático compuesto por una familia de hemoproteínas, de las que ya se han identificado más de 2000 isoformas diferentes presentes en numerosas especies, desde bacterias a mamíferos (Donato *et al.*,2004; Guerra-Rivas,

2003). Una de las características más significativas del Cyt P450 es su baja especificidad, lo que le confiere la capacidad de transformar un número casi ilimitado de sustratos, principalmente a través de reacciones de oxidación, pero también de reducción e hidrólisis. Las oxidaciones catalizadas por el Cyt P450 son reacciones asociadas a proteínas transportadoras de uno o dos electrones como la enzima NADPH citocromo P450 reductasa (NADPH cit P450 reductasa) y el citocromo b₅. En ambos casos, estos catalizadores mejoran el flujo electrónico hacia el Cyt P450, facilitando la función global del complejo y acelerando la eliminación de un gran número de fármacos y compuestos tóxicos del organismo. A pesar que estas enzimas ayudan a los procesos de detoxificación, también son responsables de la activación de toxinas o precarcinógenos (Donato *et al.*, 2004; Guerra-Rivas, 2003). La enzima NADPH cit P450 reductasa es una flavoproteína, localizada en las membranas del retículo endoplásmico, al igual que todo el complejo Cyt P450, que se encarga de transferir los electrones necesarios para la reacción desde el donador NADPH hasta el centro catalítico del Cyt P450. A diferencia del Cyt P450, la NADPH cit P450 reductasa es una sola enzima que es capaz de colaborar con todo el sistema Cyt P450 (Donato *et al.*, 2004).

Muchos microorganismos poseen la capacidad de utilizar diferentes xenobióticos como única fuente de carbono y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (Nuñez, 2003; Madigan *et al.*, 2004). El fitoplancton es abundante en el medio marino, es la base de la cadena alimenticia y tiene un papel fundamental como productor primario y a su vez en el reciclamiento de nutrientes. En los últimos 10 años se ha investigado sobre la capacidad de las microalgas para biotransformar y biodegradar contaminantes orgánicos como hidrocarburos, plaguicidas, etc., xenobióticos altamente tóxicos (Juhasz *et al.*, 2000). El uso de microalgas en la

biorremediación resulta particularmente atractivo debido a su capacidad fotosintética, en la cual a partir de energía solar y la incorporación de nutrientes, así como de diversos compuestos como fuente de energía para la producción de biomasa, proveen carbono reducido y nitrógeno a la microbiota presente en los ecosistemas acuáticos, incrementando así el potencial de degradación y eliminando compuestos contaminantes. Por otra parte, actualmente las líneas de investigación sobre biorremediación de aguas contaminadas con hidrocarburos utilizando microalgas y cianobacterias, buscan aportar los elementos necesarios para definir si estos organismos cuentan con un metabolismo capaz de degradar o remover contaminantes, así como la viabilidad de éstos para ser utilizados en reactores para el tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos (Ferrera *et al*, 2006). La limitada disponibilidad de los estudios relacionados con la degradación a partir de microalgas podría sugerir poca viabilidad en su uso y no resaltar las ventajas significativas de éstas en términos de degradación, es por eso que la investigación en los efectos y la degradación de xenobióticos en el fitoplancton es de suma importancia para ampliar el conocimiento de los riesgos y colaborar en el compromiso de revertir los efectos de contaminantes en el medio marino, así como ampliar las posibles y prometedoras ventajas a partir de estos microorganismos.

Dunaliella tertiolecta es una microalga marina unicelular de la clase Chlorophyceae, que tiene la capacidad de utilizar nutrientes inorgánicos presentes en aguas residuales y que con ayuda de energía solar produce biomasa a partir de dióxido de carbono. Esta microalga es nativa de Nueva Zelanda y se encuentra en ambientes salobres; es de célula ovalada, móvil y posee alta tolerancia a la salinidad, temperatura y luz (Instituto Nacional del Agua e Investigación Atmosférica NIWA, 1998; Belle, 2004). Esta microalga se divide por fusión binaria simple y no hay evidencia de lisis de la

célula, enquistamiento o formación de esporas (Segovia *et al.*, 2003; Belle, 2004), tiene sensibilidad moderada a sustancias tóxicas, por lo que ha sido seleccionada por el NIWA para protocolos en pruebas de toxicidad crónica marina, teniendo como valoración el crecimiento celular de la microalga en presencia de compuestos o un medio contaminado (Belle, 2004).

Por lo anteriormente expuesto, es posible afirmar que se requiere ampliar y profundizar en el conocimiento de los procesos metabólicos que ocurren en la biodegradación para poder describir las rutas metabólicas participantes en los procesos de biotransformación en las microalgas. Es necesario generar información acerca de las características y condiciones de reacción de las enzimas degradadoras, para poder manipular y mejorar sus mecanismos de acción sobre algunos de los contaminantes más hidrofóbicos, así como evitar la acumulación de inhibidores del metabolismo. El entendimiento e investigación de los aspectos bioquímicos y fisiológicos de los procesos de la biorremediación impulsaría la generación de información sobre la diversidad metabólica de los organismos biodegradadores, lo que permitiría la manipulación y control de los parámetros clave para el aprovechamiento óptimo de las actividades metabólicas. Lo anterior incluye profundizar en el entendimiento de los factores que regulan la transcripción y traducción para la biosíntesis de las enzimas degradadoras clave y de otras proteínas participantes, así como la caracterización de las enzimas y las especificaciones de los sustratos (Pieper *et al.* 2000; Singh *et al.*, 2004).

2. ANTECEDENTES

El tamaño y morfología de una célula algal tiene un papel importante en diversas actividades fisiológicas, tales como la asimilación de nutrientes, fotosíntesis, respiración y la regulación de productos de desecho (Lee, 1999). De acuerdo con estudios de acumulación de antraceno en ocho especies de microalgas, Tang *et al.* (1998) sugirieron que la morfología propia de estos organismos les confiere un alto potencial de absorción debido a su área superficial, la cual es mayor que el radio del volumen de las macroalgas. Resultados similares se observaron en dos cianobacterias y su capacidad para absorber metales (Pirszel *et al.*, 1995). En los dos estudios los resultados sugieren que otras propiedades como la composición de la pared celular y las enzimas involucradas en la desintoxicación y degradación, son de gran importancia en las diferencias en la especificidad de los organismos para la remoción de HPA's.

La utilización de organismos fotosintéticos para la oxidación de compuestos orgánicos, incluyendo los HPA's, ha sido demostrada empleando microalgas, tales como *Prototheca zopfii*, *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus acutus* y *Ankistrodesmus braunii*; *Chlamydomonas ulvaensis*, *Chlorella pyrenoidosa* y *Scenedesmus brasiliensis*, para la degradación de diversos compuestos orgánicos incluyendo derivados del petróleo e HPA's (Cerniglia *et al.*, 1980; Ellis, 1977; Narro *et al.*, 1992; Radwan *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 1975; Warshawsky *et al.*, 1995). El Grupo de Biotecnología de Microalgas del Instituto Politécnico Nacional CINVESTAV ha profundizado en la capacidad de la cianobacteria *Spirulina maxima* para remover fenantreno, HPA altamente tóxico para los organismos acuáticos. En su estudio concluyeron que la presencia del HPA no afecta de manera directa el contenido de proteína ni el crecimiento de la cianobacteria (citado por Ferrera *et al.*, 2006). Por otra

parte, Lei *et al.* (2007) examinaron cuatro especies de microalgas, las cuales tuvieron diferentes grados de asimilación y metabolismo en exposición de pireno y fluoranteno; en este caso determinaron que la remoción y transformación de los HPA's puede ser dependiente del crecimiento celular y que la capacidad de remoción es directamente proporcional a la biomasa en el medio. Chan *et al.* (2006) encontraron que la remoción de una mezcla de fenantreno, fluoranteno y pireno por *Selenastrum capricornutum* aumenta cuando se tiene una densidad celular de 5×10^4 hasta 1×10^7 cel/ml, y el proceso de remoción ésta relacionado con la vía de monooxigenasas. Walker *et al.* (1975) aislaron una microalga, *Protothea zofi*, la cual es capaz de utilizar petróleo crudo y una mezcla de hidrocarburos como sustrato, exhibiendo una extensa degradación de alcanos, así como de HPA's. Guerra-Rivas (2003) evaluó la capacidad de remoción de antraceno por *Dunaliella tertiolecta*, mediante la cuantificación del antraceno residual en el sobrenadante de exposición, a partir de lo cual determinó que *D. tertiolecta* tiene la capacidad de remover antraceno del medio. Esta misma especie de microalga ha sido empleada para determinar la toxicidad de efluentes en ambientes marinos, ya que es una especie moderadamente sensible a sustancias tóxicas, siendo la inhibición del crecimiento celular el parámetro de toxicidad (NIWA, 1998).

El uso de las enzimas, ya sea aisladas o como parte de células vivas, ha sido desarrollado de forma rigurosa y sistemática como procesos catalíticos industriales económicamente viables y amigables con el medio ambiente, progresando a la par con el rápido avance y expansión de la biotecnología moderna (Feng, 2005). Existen estudios que reportan el papel de las enzimas como principales responsables de la degradación de HPA's. Varias enzimas participantes en la desintoxicación de fluoranteno y pireno han sido encontradas en nueve especies de microalgas del Ártico y Antártico (Pflugmacher *et al.*, 1999). Lei *et al.* (2003) reportaron que la glutatión S-

transferasa (GST) juega un papel importante en la biotransformación de pireno llevada a cabo por especies microalgales y que su actividad varía de especie a especie. Kirso *et al.*, (1998) estudiaron la biotransformación de BaP, HPA, a partir de seis diferentes especies de microalgas; concluyeron que la biotransformación es dependiente únicamente del sistema enzimático en cada una de las especies, incluyendo la o-difenol oxidasa, Cyt P450. El Cyt P450 es considerado en ser el principal complejo enzimático involucrado en la primera fase de transformación (Roy *et al.*, 1995). Recientemente, las actividades del Cyt P450 han sido demostradas en macroalgas marinas clorofitas, cromofitas y rodofitas (Pflugmacher *et al.*, 1998). Se cree que el Cyt P450 está involucrado en la biotransformación de herbicidas en la alga verde unicelular *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella fusca*, así como en la degradación de BaP por la alga verde de agua dulce *S. capricornutum*, especie que es capaz de conjugar metabolitos con grupos sulfato y glucosa (Yang *et al.*, 2002). En algunos estudios se han encontrado correlaciones positivas entre el Cyt P450, la enzima NADPH cit P450 reductasa y la concentración de HPA's, tanto en condiciones de laboratorio como en el campo (Garrigues *et al.*, citado por Livingstone *et al.*, 1990). Guerra-Rivas (2003) y Gómez-Gutiérrez (2004) han caracterizado la inducción y papel oxidativo de la enzima NADPH cit P450 reductasa en la anémona *Anthopleura elegantissima* asociada al metabolismo de HPA's.

Los estudios acerca de la degradación de HPA's se han enfocado principalmente en bacterias y hongos, pero se ha puesto poca atención al papel que las microalgas desempeñan en estos procesos, a pesar de que éstas han sido empleadas en el tratamiento de aguas residuales y han mostrado ser viables para la remoción de contaminantes orgánicos tóxicos (Semple *et al.*, 1999; Lei *et al.*, 2002; Tam *et al.*, 2002, Belle, 2004). Lo anterior, sugiere que cepas bacterianas con capacidad degradadora de

HPA's emplean una enzima en común con las microalgas para degradar dos o más HPA's (Stringfellow y Aitken, 1995); sin embargo, no está claro cómo las microalgas usan el mismo sistema enzimático degradador (Lei *et al.*, 2007). Mientras los mecanismos de biotransformación y biodegradación de xenobióticos han sido estudiados extensivamente en bacterias, plantas mayores y animales, existe poca información concerniente a microalgas (Yang *et al.*, 2002), así como lo concerniente al Cyt P450, del cual en general no existen reportes en microalgas (Raucy y Allen, 2001). La información es insuficiente e inconsistente en relación a las capacidades degradadoras de las microalgas sobre HPA's. Es por eso que se requiere profundizar en estudios que permitan entender los sistemas enzimáticos involucrados en la remoción y degradación de HPA's realizada por microalgas (Lei *et al.*, 2007).

3. HIPOTESIS

La microalga *Dunaliella tertiolecta* induce la actividad de NADPH citocromo P450 reductasa al ser expuesta a un HPA.

4. OBJETIVO

Evaluar la actividad de NADPH citocromo P450 reductasa en la microalga *Dunaliella tertiolecta* al ser expuesta a benzo [a] pireno.

5. METODOLOGIA

5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se instaló un sistema de cultivo que permitió el crecimiento y abastecimiento de la microalga a lo largo de la experimentación. Previo a la exposición de *D. tertiolecta* al hidrocarburo, se definieron las condiciones experimentales de los procesos realizados, entre ellas, velocidad de centrifugación, concentración del amortiguador de fosfatos utilizado y densidad celular adecuada para el ensayo. Con el fin de estimar la cantidad de proteína presente en cada ensayo enzimático, se estimó la relación entre la densidad celular y la cantidad de proteína presente. Para los ensayos de exposición de *D. tertiolecta* a BaP, se conformaron tres grupos, los controles de microalga y de solvente, así como el grupo de exposición al hidrocarburo. Se manejaron dos concentraciones de BaP, con un intervalo de tiempo de exposición. El sistema de exposición contó con aireación y luz continua, manteniéndose a temperatura controlada. Cumplido el tiempo de exposición, cada muestra fue lavada y suspendida en amortiguador de fosfatos, obteniéndose el paquete celular para el ensayo enzimático.

5.2. EXPERIMENTACION PREVIA

5.2.1. Obtención y mantenimiento de microalgas

A partir de una cepa de la colección del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) se instaló un sistema de cultivo de la microalga *Dunaliella tertiolecta* (Fig. 1), con el cual se mantuvieron microalgas saludables que sostuvieron los requerimientos experimentales. La microalga fue cultivada en un volumen inicial de 350 mL y escalamientos consecuentes hasta un volumen final de 2 L. El cultivo se mantuvo a temperatura ambiente (22 a 25° C), con

iluminación continua de luz blanca fría. Durante todo el mantenimiento, las microalgas fueron monitoreadas mediante curvas de crecimiento haciendo recuentos celulares diariamente. Para el recuento, las muestras se fijaron en lugol y se contó empleando un hematocitometro con cámara Neubauer a través de un microscopio de luz visible Leica CM E.



Fig. 1. Cultivo de la microalga *Dunaliella tertiolecta* en el Laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina, UABC.

5.2.2. Determinación de condiciones de experimentación

Se definió la densidad celular viable para la obtención del paquete celular para la evaluación de la actividad enzimática, así como dirigida la velocidad de centrifugación que permitiera obtener un empaquetamiento sin daño celular y con una mínima pérdida de células al decantarlo. Se evaluaron por triplicado cuatro diferentes densidades celulares de la microalga *D. tertiolecta* contenidas en agua de mar, en tubos de ensayo. De cada tubo se tomó 1 mL y se fijó con lugol para realizar conteo celular anterior a la

centrifugación. En una primera evaluación se centrifugaron las muestras a 1600 y 3000 rpm por 10 min en una centrifuga clínica Clay Adams modelo Triac, mientras que en una segunda evaluación únicamente se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. Después de centrifugar se decantó el sobrenadante y el paquete celular se suspendió en 2 mL de agua de mar, aplicando agitación con un vortex digital VWR. Se tomó 1 mL de la fracción celular homogenizada y se fijó con lugol para realizar conteo celular.

Así mismo, se evaluó el efecto del amortiguador de fosfatos sobre la integridad celular de la microalga *D. tertiolecta* al ser lavada y suspendida en el mismo. Se inoculó la microalga en 8 mL de agua de mar en seis tubos de ensayo, todos con la misma densidad celular. Dos de estas muestras se utilizaron para lavar y resuspender en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7, mientras que en otras dos se utilizó amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7 y en las dos restantes se utilizó agua de mar. Toda vez que las muestras fueron inoculadas, se observó su condición celular en microscopio de luz visible Leica CM E. Posteriormente las muestras se centrifugaron dos veces a 3000 rpm por 10 min, obteniéndose el paquete celular, el cual se resuspendió en un volumen conocido de amortiguador de fosfatos o agua de mar aplicando agitación con vortex. Finalizada la segunda resuspensión se tomó un volumen para observar la condición celular a través del microscopio.

Por otra parte, se evaluó la actividad enzimática a diferentes densidades celulares de *D. tertiolecta*. A partir de cinco densidades celulares, las muestras fueron tratadas y preparadas para el ensayo enzimático de la misma manera que las muestras de exposición. Una vez lavadas y obtenida la fracción celular de cada una de las densidades y sus réplicas se procedió a la evaluación enzimática.

5.2.3. Cuantificación de proteínas

Con la finalidad de estimar la cantidad de proteína presente en cada ensayo enzimático y poder referenciar la actividad enzimática evaluada, se preparó una curva de calibración para determinar la relación entre la densidad celular y la cantidad de proteína contenida. El contenido de proteína de la fracción celular contenida en cada ensayo enzimático fue determinado indirectamente, a partir de la relación de la densidad celular y su contenido proteico. Con el fin de mantener la relación para las estimaciones siguientes, los ensayos se realizaron cuando el cultivo se encontraba en fase exponencial y con una densidad celular de 2.6×10^6 cel/mL. Las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry (1951), realizándose previamente su extracción mediante el procedimiento descrito en Raush (1981), el cual consistió en someter las muestras a hidrólisis alcalina aplicando calor mediante un termo baño a 100° C por 60 min y empleando NaOH 0.1 N. La determinación de proteínas por el método de Lowry *et al.* (1951) se basa en la medición espectrofotométrica a 750 nm de la intensidad de color obtenido con el reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-túngstico: FMT), después de un tratamiento con solución alcalina de cobre. La curva de calibración se preparó con una solución concentrada de 300 μ g/mL de seroalbúmina de bovino (BSA), a partir de la cual se hicieron estándares desde 0 a 150 μ g/ml. Todas las muestras se trabajaron por triplicado.

5.3. EXPOSICION DE LA MICROALGA *Dunaliella tertiolecta* A BENZO[a]PIRENO

5.3.1. Ensayo de exposición de *Dunaliella tertiolecta* a benzo[a]pireno

El sistema de exposición (Fig. 2) consistió en: 54 tubos de ensaye, los cuales contenían, cada uno, microalgas inoculadas en agua de mar a una densidad celular de

1.2×10^6 cel/mL. Una vez preparados los tubos, se conformaron tres grupos: microalgas expuestas a BaP (GBaP), microalgas expuestas a acetonitrilo (GAc) y microalgas sin exposición (GC). A los grupos GBaP y GAc se les agregó la cantidad correspondiente de BaP o de solvente, según el grupo experimental y la concentración determinada. A cada uno de los tubos de ensaye se le colocó aireación y agitación mediante mangueras de 2 mm de diámetro y pipetas Pasteur que inyectaron aire filtrado. El sistema se colocó en un laboratorio húmedo, con iluminación continua de luz blanca fría y temperatura controlada a 22°C. En base al trabajo realizado por Guerra-Rivas (2003), se manejaron dos concentraciones de BaP, una baja de 1.3 µg/L y una alta de 3.8 µg/L, con períodos de exposición desde 2 hasta 27 h, todas las muestras se hicieron por triplicado. Para emplear el BaP en el medio de exposición se utilizó una solución patrón recientemente preparada con acetonitrilo como solvente. A partir de esta solución se agregó el volumen necesario para tener la concentración deseada en cada recipiente utilizado en el ensayo de exposición. Los recipientes y material empleados fueron previamente lavados con jabón y ácido nítrico, enjuagando con agua potable y posteriormente con agua destilada para finalmente esterilizarlos en autoclave.



Fig. 2. Sistema de exposición de *Dunaliella tertiolecta* a benzo[a]pireno.

5.3.2. Obtención del paquete celular

Los tubos con las microalgas fueron centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos y lavados con agitación suave en 5 mL de amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7. El paquete celular obtenido en una segunda centrifugación fue resuspendido en 1.3 mL del amortiguador, del cual 0.1 mL se utilizó para la evaluación de la actividad enzimática y el resto para realizar el conteo celular.

5.3.3. Ensayo para NADPH citocromo P450 reductasa

Se cuantificó la actividad de la NADPH cit P450 reductasa empleando el método de Heffernan *et al.* (1998), con modificaciones realizadas por Gómez-Gutiérrez (2004). La mezcla de reacción contenía: citocromo c 0.050 mM, cianuro de potasio KCN 1mM, amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7 y 0.04 mL de fracción celular. La reacción inició mediante la adición de NADPH 1 mM, ajustando a un volumen final de reacción de 1.01 mL. La reacción se monitoreó mediante la reducción del citocromo c a 550 nm en un

espectrofotómetro Thermo Helios Gamma UV. La actividad enzimática fue expresada en nanomoles de citocromo c reducido y calculada mediante la ecuación (1):

$$1 \times 10^3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} = (\Delta A/\Delta t * \text{Vol}_{\text{rx}}) / (\varepsilon * b * \text{mg}) \quad \text{Ec. 1}$$

Donde

$\Delta A/\Delta t$ = cambio en la absorbancia durante el tiempo de reacción

Vol_{rx} = volumen total de reacción (1.01 mL)

ε = coeficiente de extinción molar de citocromo c ($21 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$)

b = espesor de la celda (1 cm)

mg = cantidad de proteína presente en la reacción

5.4. ANALISIS ESTADISTICO

Se analizó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En caso de tener datos normales se aplicó la prueba de Bartlett para evaluar la homogeneidad de varianzas de los datos. Comprobando lo anterior se realizó un análisis de varianza para determinar si existían diferencias significativas en la actividad enzimática, así como en la densidad celular, según el tratamiento y tiempo de exposición de cada muestra y la concentración de BaP a la que fueron sometidas ($\alpha = 0.05$). En el caso de existir diferencias significativas entre el tipo y/o tiempo de exposición se empleó la prueba de Dunnett para realizar comparaciones entre el control y las muestras. Para datos no paramétricos, se aplicó la prueba de Kruskal Wallis; en el caso de existir diferencias significativas se empleo la prueba de Tukey no paramétrica (Zar, 1999).

6. RESULTADOS

6.1. EXPERIMENTACION PREVIA

6.1.1. Determinación de condiciones de experimentación

Al evaluar el proceso de centrifugación se obtuvo que a 1600 rpm se observó buen empaquetamiento a mayor densidad celular. A 3000 rpm se observó mejor empaquetamiento que a 1600 rpm (Tabla I). La densidad más viable fue de 1×10^6 cel/mL con una centrifugación de 3000 rpm, ya que bajo estas condiciones no se observó daño celular visible y no se tuvo pérdida celular. Una segunda evaluación a 3000 rpm (Tabla II) mostró que a mayor densidad celular se observa un mejor empaquetamiento celular; sin embargo, el pellet no puede ser suspendido con agitación suave. A densidades celulares de 8×10^6 cel/mL se registró pérdida celular en comparación a densidades de 1 a 4×10^6 cel/mL.

En lo concerniente a la evaluación de los efectos del amortiguador de fosfatos a dos concentraciones, se observó daño y ligero rompimiento en las células lavadas y suspendidas en amortiguador de fosfatos a 0.1 M, en el amortiguador de fosfatos 0.05 M el daño fue mayor y no se observó movilidad de las células. En cuanto al lavado y suspensión en agua de mar, se observó que las células no presentaban daño aparente. Para los requerimientos posteriores al lavado y resuspensión de la microalga se determinó la decisión de utilizar el amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.

Tabla I. Evaluación preliminar del efecto de la centrifugación en la microalga *Dunaliella tertiolecta*.

Densidad inicial	Densidad final 1600 rpm	Observaciones 1600 rpm
712500	362500	Muy pocas células rotas
1325000	1050000	Algunos fragmentos y células deformadas y/o abiertas
1962500	850000	Algunas células abiertas
2212500	1500000	Algunas células abiertas y/o fragmentadas. Buen estado
Densidad inicial	Densidad final 3000 rpm	Observaciones 3000 rpm
712500	1075000	Células sin daño visible
1325000	2815500	Mitad de células abiertas. Conglomerados
1962500	3025000	Mitad de células abiertas y/o fragmentadas
2212500	6587500	

Densidad inicial se refiere al número de células/mL antes de centrifugar. La densidad final se refiere al número de células/mL después de centrifugar.

Tabla II. Evaluación definitiva del efecto de la centrifugación a 3000 rpm en la microalga *Dunaliella tertiolecta*.

Densidad inicial	Densidad final 3000 rpm	Observaciones 3000 rpm
1125000	1737500	Células sin daño visible
4687500	3862500	Células sin daño visible. Conglomerados
4825000	2437500	Células sin daño visible. Conglomerados
8375000	5750000	Células sin daño visible. Conglomerados

Densidad inicial se refiere al número de células/mL antes de centrifugar. La densidad final se refiere al número de células/mL después de centrifugar.

La evaluación de la actividad enzimática de NADPH cit P450 reductasa a diferentes densidades celulares de la microalga *D. tertiolecta* (Fig. 3) mostró que a menor densidad celular, mayor actividad enzimática. Así mismo, los datos crudos mostraron que conforme aumentó la densidad celular aumentó la absorbancia (Fig. 4). Por otra parte se observó que a mayor cantidad de proteína presente, se registró una mayor absorbancia hasta llegar al valor de proteína de 0.0058 mg, en el cual se observó un decremento en la absorbancia (Fig. 5).

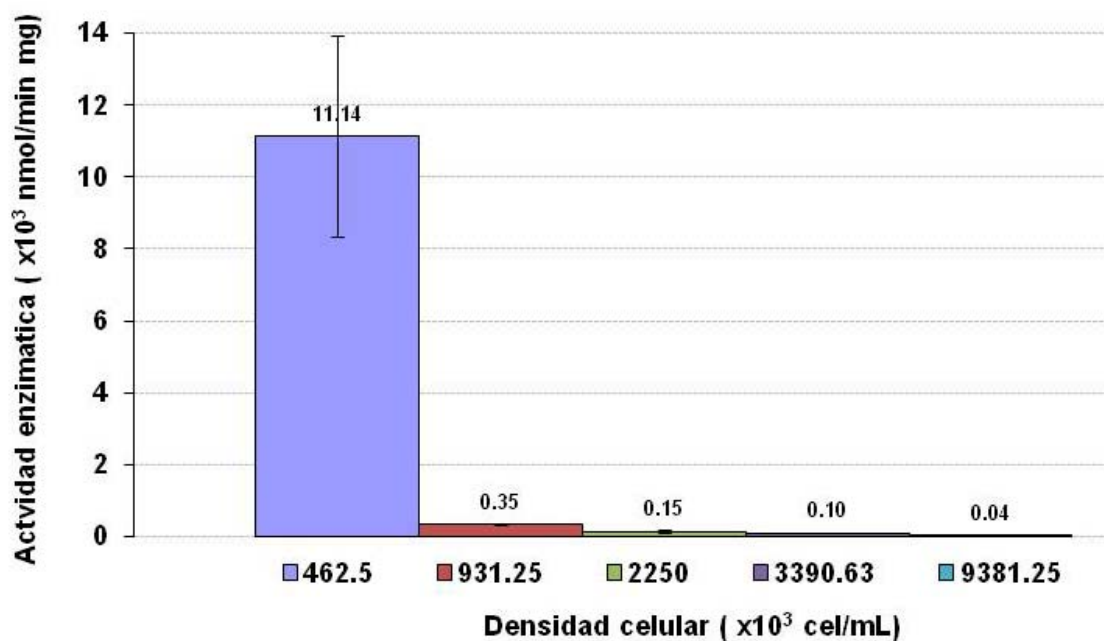


Fig. 3. Actividad enzimática de NADPH cit P450 reductasa en función de la densidad celular de la microalga *Dunaliella tertiolecta*. En la parte superior de cada columna se muestra el valor de la actividad enzimática ($\times 10^3$ nmol/min mg). Se muestra la desviación estándar de cada valor de actividad enzimática, con $n = 3$.

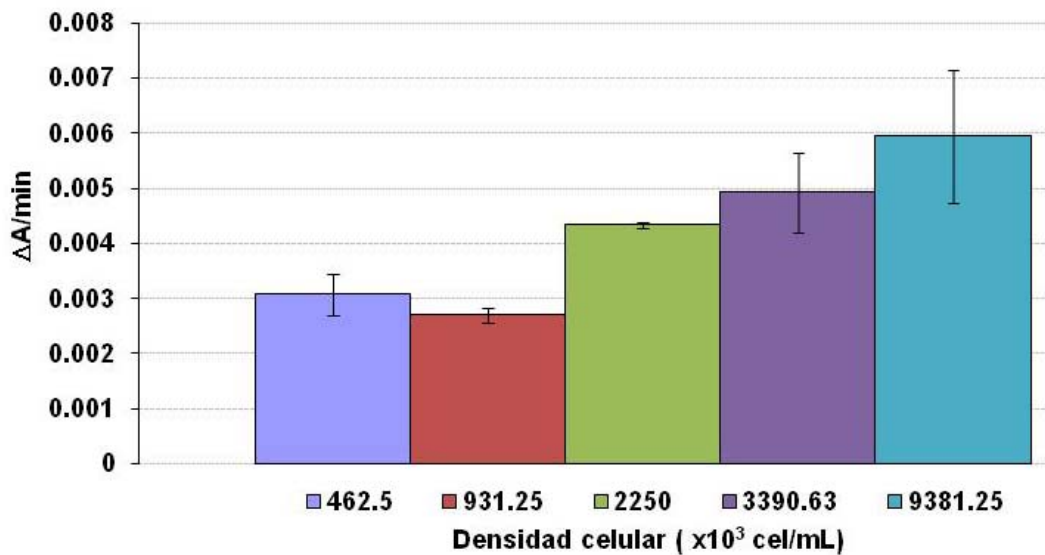


Fig. 4. Valores del cambio en la absorbancia conforme el tiempo ($\Delta A/\text{min}$) en el ensayo enzimático, para cada densidad celular. Se muestra la desviación estándar de cada valor de actividad enzimática, con $n = 3$.

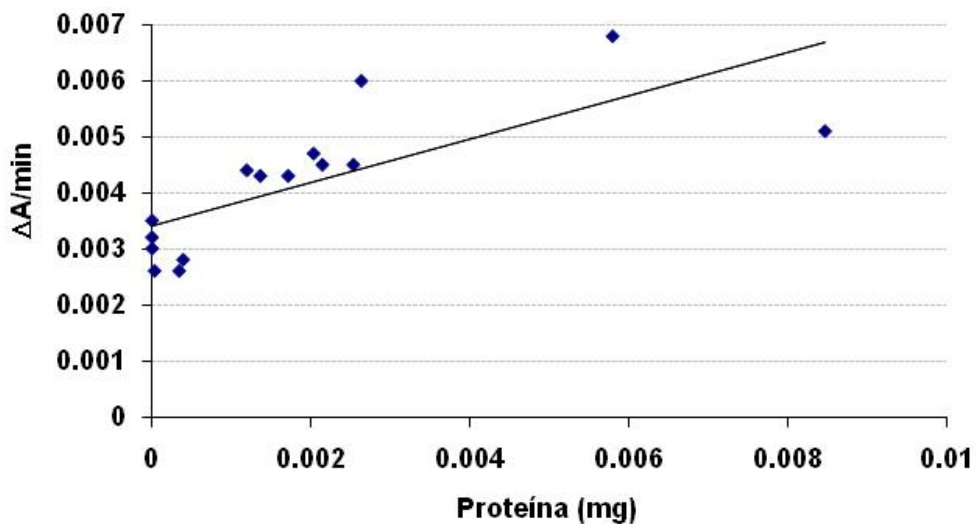


Fig. 5. Valores del cambio en la absorbancia conforme el tiempo ($\Delta A/\text{min}$) en el ensayo enzimático en relación a la cantidad de proteína presente.

6.1.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en las muestras a diferentes densidades celulares de *D. tertiolecta* sp, se calculó en función de la ecuación obtenida mediante la curva de calibración ($y = 428.43 x - 3.7137$; $R^2 = 0.99$). Los datos obtenidos se

graficaron utilizando los datos de densidad celular como variable independiente y como variable dependiente el contenido de proteína (Fig. 6) y se obtuvo la ecuación: $y = 2 \times 10^{-8} x - 0.0092$; $R^2 = 0.98$. A partir de lo anterior, se definió la relación de densidad celular y contenido de proteína, con lo cual se calculó el contenido proteico en las fracciones celulares de *D. tertiolecta* utilizadas en los ensayos enzimáticos.

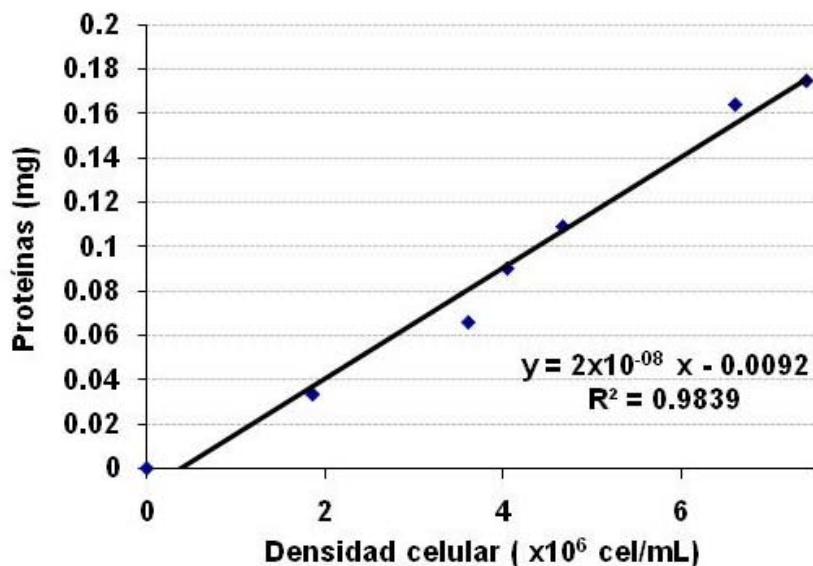


Fig. 6. Relación de la cantidad de proteína según la densidad celular de la microalga *Dunaliella tertiolecta* en fase exponencial.

6.2. EXPOSICIÓN DE LA MICROALGA *Dunaliella tertiolecta* A 1.3 $\mu\text{g/L}$ DE BENZO[a]PIRENO

La actividad enzimática evaluada en los grupos de experimentación GC (control), GAc (solvente) y GBaP (BaP 1.3 $\mu\text{g/L}$), se muestran en la Tabla III. La actividad enzimática más alta, 481.2 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, se observó a las 2 h de exposición; así mismo, el valor más bajo, 18.6 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ también se presentó en este grupo a las 27 h de exposición. El grupo GC presentó diferencias significativas en la actividad enzimática entre los diferentes tiempos de exposición y el tiempo inicial. El grupo GAc presentó su actividad enzimática más alta, 123.87 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, a las 2 h,

posteriormente disminuyó y se mantuvo constante; la actividad mas baja se observó a las 27 h ($29.76 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). El grupo GAc presentó diferencias significativas entre las muestras correspondientes a los diferentes tiempos de exposición; sin embargo, no tuvo diferencias significativas con el grupo GC. El grupo GBaP, mostró una actividad enzimática variable a lo largo del tiempo de ensayo, teniendo su mayor actividad en el tiempo inicial con $336.7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, y posteriormente disminuyó. La actividad mas baja de este grupo se observó a las 12 h. El grupo GBaP presentó diferencias significativas en la actividad enzimática a lo largo del ensayo; sin embargo, no tuvo diferencias significativas en su actividad con respecto a la actividad de los otros dos grupos, GC y GAc.

Tabla III. Actividad enzimática de NADPH citocromo P450 reductasa de la microalga *Dunaliella tertiolecta* expuesta a $1.3 \mu\text{g/L}$ de benzo[a]pireno en un intervalo de tiempo.

	Tiempo exposición (horas)					
	2	7	10	12	14	27
Grupo	Actividad enzimática (nmol/min mg)					
GC	481.29 ± 201.0	68.21 ± 2.2	66.15 ± 23.4	35.18 ± 11.7	75.19 ± 14.2	18.59 ± 1.5
Gac	123.87 ± 13.7	62.38 ± 16.5	57.12 ± 3.4	60.90 ± 16.7	82.47 ± 14.1	29.76 ± 4.2
GBaP	336.70 ± 308.6	50.17 ± 13.1	71.02 ± 15.6	32.29 ± 2.2	104.20 ± 27.4	33.09 ± 9.7

Los valores se presentan con la desviación estándar correspondiente.

6.3. EXPOSICIÓN DE LA MICROALGA *Dunaliella tertiolecta* A $3.8 \mu\text{g/L}$ DE BENZO[a]PIRENO

La actividad enzimática evaluada en los grupos de experimentación GC (control), GAc (solvente) y GBaP (BaP $3.8 \mu\text{g/L}$), se muestran en la Tabla IV. El valor más alto de actividad enzimática, $294.9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ se presentó en el grupo GBaP, a las 6 h de exposición; así mismo, en este grupo se presentó el valor más bajo, $81.6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ a las 9 h de exposición. El grupo GC mostró su actividad más alta, $237.1 \text{ nmol min}^{-1}$

mg^{-1} , a las 2 h de exposición; posteriormente disminuyó y se mantuvo constante, sin presentarse diferencias significativas de la actividad enzimática entre las microalgas expuestas a lo largo del ensayo.

Tabla IV. Actividad enzimática de NADPH citocromo P450 reductasa de la microalga *Dunaliella tertiolecta* expuesta a 3.8 $\mu\text{g/L}$ de benzo[a]pireno en un intervalo de tiempo.

Grupo	Tiempo exposición (horas)				
	2	6	9	12	15
	Actividad enzimática (nmol/min mg)				
GC	237.13 \pm 72.3	149.78 \pm 51.4	157.03 \pm 22.6	168.85 \pm 25.3	168.60 \pm 22.8
Gac	107.47 \pm 4.0	159.28 \pm 39.9	133.23 \pm 15.1	125.91 \pm 28.9	154.06 \pm 55.7
GBaP	179.54 \pm 67.6	294.99 \pm 112.1	81.62 \pm 7.3	160.52 \pm 28.6	164.50 \pm 18.4

Los valores se presentan con la desviación estándar correspondiente.

En el grupo GAc, se observaron valores entre 107.4 y 159.2 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, la actividad enzimática no tuvo diferencia significativa a lo largo del ensayo. Sin embargo, entre los grupos GAc y GC se encontraron diferencias significativas en el tiempo de exposición correspondiente a las 2 h, en donde el grupo GC tuvo mayor actividad enzimática que el grupo GAc. En el grupo GBaP se encontraron actividades en el intervalo de 81.6 a 294.9 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, estos valores correspondieron a las muestras que se expusieron durante 6 y 9 h respectivamente, estos dos tiempos tuvieron diferencias significativas con respecto a la actividad inicial encontrada para este grupo. Así mismo, el grupo GBaP presentó actividades enzimáticas significativamente diferentes al grupo GC; a las 6 h la actividad fue mayor que la del grupo GC, mientras que a las 9 h disminuyó siendo significativamente menor que la actividad del grupo GC.

7. DISCUSIÓN

Durante la experimentación preliminar se establecieron las condiciones óptimas para llevar a cabo la manipulación de las microalgas durante los experimentos de exposición de *D. tertiolecta* al BaP. A continuación se presentan los aspectos mas relevantes de la evaluación realizada, en relación a la velocidad de centrifugación, la mejor densidad celular para ser usada en los ensayos de toxicidad y el amortiguador de fosfatos seleccionado para realizar la suspensión de células después de la exposición al tóxico. En relación al paquete celular, se hizo también una evaluación del contenido de proteína mínimo necesario para llevar a cabo la evaluación de la actividad enzimática.

La pérdida de células registrada después de la centrifugación a 1600 rpm sugiere que el empaquetamiento celular no es eficaz a esta velocidad. Después de centrifugar a 3000 rpm, la densidad celular fue mayor que la registrada antes de centrifugar, sugiriendo que se realiza un empaquetamiento celular óptimo y que resultó en un conteo más preciso que el anterior a la centrifugación. Por el daño celular (abertura, fragmentación y/o deformación) observado después de centrifugar en la primera evaluación, se infiere que se debió principalmente a contaminación de las muestras fijadas en presencia de microorganismos contenidos en el agua de mar. El problema observado para densidades celulares mayores a 1×10^6 cel/mL fue la formación de conglomerados, los cuales no permitieron suspender fácilmente las células y por lo tanto, las muestras no pudieron ser homogenizadas. Para evitar daño celular y propiciar el mantenimiento de la integridad celular, se decidió utilizar una velocidad de centrifugación de 3000 rpm, manejando una densidad celular de 1×10^6 cel/mL.

Los efectos sobre las células al utilizar amortiguador de fosfatos como solución de lavado fueron evidentes al comparar con las células en las que se utilizó agua de mar. Estas células no presentaron daño en comparación con la ruptura de membranas observada al utilizar amortiguador de fosfatos 0.1 M, la que pudo haberse ocasionado por el cambio osmótico ocasionado por la solución amortiguadora. Cabe mencionar que el perfil lipídico general de las microalgas se caracteriza por la presencia de altas cantidades de lípidos neutros, principalmente glicéridos, los cuales representan una fuente potencial de glicerol, el cual puede incrementarse en respuesta a un aumento de la presión osmótica externa, aspecto conocido en el género de *Dunaliella* (Avron 1992; Shariati *et al.*, 1994). Se ha observado que, tanto la síntesis de glicerol bajo condiciones hipertónicas, como su eliminación bajo condiciones hipotónicas, es eficaz e independiente de procesos tales como la síntesis de proteínas y que puede ocurrir tanto en condiciones de luz como de oscuridad. Así mismo, las células de *Dunaliella sp.* están contenidas por una membrana plasmática elástica, cubierta por una superficie mucosa que se encoge o se expande rápidamente cuando se expone a condiciones hipertónicas o hipotónicas, respectivamente (Ben-Amotz *et al.*, 1990; Ben-Amotz, 1993). La evidente fragmentación e inmovilización de células al emplear el amortiguador 0.05 M pudo deberse a un efecto hipotónico. A pesar de que la solución que contenía a las microalgas era baja en concentración de solutos, se produjeron efectos de ósmosis hacia el interior de las células ocasionando su rompimiento y mortandad. Al suspender y volver a centrifugar, el empaquetamiento celular fue más notorio para las células contenidas en amortiguador, en comparación con las contenidas en agua de mar, pudiendo confirmar e indicar que las células no estaban en condición de suspenderse; o bien sus membranas fueron destrozadas, siendo la suspensión más fácil de empaquetar por contener fragmentos o células muertas. Por lo anteriormente analizado y con base a la observación microscópica de mínima aparición de fragmentos de membrana, para

protección de la misma durante la experimentación, se optó por utilizar el amortiguador que contenía 1 mol por litro.

Respecto a la evaluación de la relación entre la densidad celular y la cantidad de proteína presente con la actividad enzimática de NADPH cit P450 reductasa se observó que a menores densidades celulares, equivalente a menor cantidad de proteína, se registró una mayor actividad enzimática. Esto se explica si consideramos lo siguiente. El componente cuantitativamente más importante de la biomasa orgánica de la mayoría de las microalgas son las proteínas, las cuales pueden representar hasta más del 50% del peso seco total (Arredondo *et al.*, 2007). A medida que se aumenta la cantidad de ésta al tomar más homogenado para la medición de la enzima, se aumentan todos sus componentes. Sin embargo, el incremento de proteína por aumento de biomasa no garantiza el aumento de los demás componentes en niveles suficientes para observar la actividad enzimática, ya que en particular, la NADPH cit P450 reductasa requiere un continuo aporte del cofactor NADPH para llevar a cabo su actividad de manera satisfactoria.

Para la evaluación de la actividad enzimática en *D. tertiolecta* en relación a su exposición a 1.3 $\mu\text{g/L}$ de BaP, no se presentaron diferencias significativas entre grupos de exposición en la actividad enzimática a lo largo del tiempo. Es decir, a ninguno de los tiempos medidos en su actividad enzimática, se observó diferencias entre el grupo GC, GAc o GBaP. Ante esto, se puede inferir que la concentración de 1.3 $\mu\text{g/L}$ de BaP no afecta a la microalga, así como tampoco le afecta la cantidad de acetonitrilo. Esto concuerda con lo encontrado en el estudio realizado por la Universidad de Washington en el cual se define el valor promedio de la EC50 (concentración a la cual se presenta el 50% de la respuesta posible en presencia de un compuesto o concentración efectiva

media) para microorganismos del grupo clorofita. Para este grupo, el estudio reporta un valor de EC50 de 5.7 $\mu\text{g/L}$ de BaP (Van Brummelen *et al.*, 1998). Por lo anterior, es posible suponer que 1.3 $\mu\text{g/L}$ de BaP no es una concentración que altere la actividad enzimática de NADPH cit P450 red en la microalga *D. tertiolecta*. Por otra parte, el comportamiento enzimático del grupo GC mostró que la actividad enzimática fue diferente con respecto a la del tiempo inicial; lo mismo se observó en los grupos GAc y GBaP. Considerando que la concentración de BaP y la cantidad de acetonitrilo no afectan la actividad enzimática en la microalga, estas diferencias pueden ser resultado del crecimiento y desarrollo natural de la microalga. En el grupo GAc, la actividad enzimática inicial fue significativamente mayor que la actividad registrada en los tiempos siguientes, indicando que la actividad enzimática fue estimulada inicialmente en presencia del acetonitrilo, o bien, la microalga fue capaz de utilizar el acetonitrilo como nutriente, aspecto que no es posible afirmar de manera concluyente mediante el diseño experimental aplicado en este estudio. En los grupos GC y GBaP, el análisis estadístico también indicó que había diferencias significativas en la actividad enzimática a lo largo del tiempo para cada uno. Sin embargo, no se pudieron establecer los tiempos entre los cuales se daban estas diferencias, debido a la gran incertidumbre de esos datos reflejado en sus grandes desviaciones estándar.

En el caso de la exposición de *D. tertiolecta* a 3.8 $\mu\text{g/L}$ de BaP, el grupo GBaP fue el único que mostró diferencias significativas en su actividad enzimática con respecto a la actividad enzimática de la microalga en el tiempo inicial. Para esta concentración se encontraron diferencias significativas entre la actividad enzimática de los grupos GC, GAc y GBaP, es decir, sí hubo diferencias entre las microalgas expuestas a BaP y acetonitrilo, así como las no expuestas. Estas diferencias se

observaron en las primeras 9 h de exposición, mientras que a partir de las 12 h no hubo diferencias significativas entre la actividad enzimática de los grupos trabajados. A las 2 h de exposición, la diferencia en la actividad enzimática se presentó entre el grupo GC y el grupo GAc, siendo mayor el primero. Lo anterior viene a reafirmar lo observado en la concentración de 1.3 µg/L, durante el cual el acetonitrilo presentó un efecto estimulante en la actividad enzimática al inicio de la exposición de la microalga. A las 6 h de exposición, la diferencia en la actividad enzimática se presentó entre el grupo GC y el grupo GBaP, siendo significativamente mayor la del grupo GBaP. Lo anterior puede sugerir estimulación enzimática en *D. tertiolecta* debido a su exposición al BaP por más de 2 h. Este aumento en la actividad enzimática no puede ser considerado como inducción, ya que este efecto no fue constante a lo largo de la exposición a BaP. En contraste, a las 9 h de exposición, la diferencia significativa nuevamente se dio entre el grupo GC y el grupo GBaP, sin embargo fue el grupo GC el que presentó una actividad enzimática mayor que la del grupo GBaP, sugiriendo así un efecto inhibitorio.

La falta de consistencia en la respuesta enzimática en presencia de BaP, puede deberse a que la adaptación o aclimatación de microorganismos a un cierto contaminante determina la rapidez con la que éste puede ser transformado y/o mineralizado. Esta adaptación puede expresarse en mecanismos interrelacionados: a) la inducción y/o depresión de enzimas específicas, b) cambios genéticos para adquirir capacidades metabólicas y c) en el enriquecimiento de aquellos microorganismos capaces de metabolizar el contaminante (Spain *et al.*, 1980; Spain, 1983). De los mecanismos anteriores, la inducción y/o depresión enzimática podría ser el más probable en función de lo observado en este trabajo. Considerando la aparente aclimatación del microorganismo al compuesto, dando como resultado incremento/decremento del metabolismo, los cambios observados en la actividad enzimática podrían atribuirse a la baja especificidad por el HPA y/o a la existencia de

varias posibles vías metabólicas de HPA's (Bauer *et al.*, 1988). Yang *et al.* (2002) observó que no hay inducción significativa en la expresión genética del citocromo P450 en la diatomea *Skeletonema costatum* al ser expuesta a 2,4 – diclorofenol (2,4-DCP). Stegeman (1985) indica que las posibles inconsistencias entre el NADPH y el metabolismo de BaP se deben a posibles intervenciones de catalizadores adicionales al citocromo P450, sugiriendo mecanismos de peroxidación, tales como co-oxigenación por la síntesis de prostaglandina (Marnett *et al.*, 1980), peroxidación lipídica (la cual posiblemente involucra a la NADPH cit P450 red) (Morgenstern *et al.*, 1981) u otros mecanismos de endoperoxidasa (Sloan, 1981). Estos mecanismos de peroxidación se han confirmado en el metabolismo de BaP, debido a la producción de derivados quinona (1,6 y 3,6-quinona) a través de la autoxidación de los metabolitos 1-hidroxi y 3-hidroxi-BaP (Stegeman *et al.*, 1984), siendo que NADPH cit P450 red metaboliza la quinona produciendo así radicales de semiquinona altamente reactivos mediante la reducción con un electrón (Nakamura *et al.*, 1994). La enzima peroxidasa máxima (POX) es considerada por ser una enzima importante en el metabolismo de BaP en algunas clorofitas marinas como *Enteromorfa intestinalis* y *Chladorfora glomerata* (Kirso e Irha, 1998). Para el caso de la diatomea *S. costatum* expuesta a 2,4 – DCP, Cyt P450 y POX aparentan no ser relevantes en el proceso de degradación de ese compuesto, confirmándose a través de inhibidores del Cyt P450 como son: 1-aminobenzotriazol (ABT) y butóxido de piperonilo (PBO) (Yang *et al.*, 2002). De manera similar, el BaP en *D. tertiolecta* podría ser procesado en un primero momento por la NADPH cit P450 reductasa, para ser encausado posteriormente a otras vías. En un compendio realizado por Zazueta (2008), referente a las oxigenasas como paso inicial en la biodegradación de hidrocarburos por el hongo *Mucor circinelloides*, menciona la afinidad sobre los sustratos aromáticos debido a di-oxigenasas, aún considerando la presencia de monooxigenasas del tipo del cit P450. Estas han sido descritas en organismos del tipo

de las levaduras y se cree que comparten algunas características en las funciones metabólicas con los microorganismos marinos (Beller *et al.*, 1998).

En los mecanismos de biotransformación, los mecanismos iniciales pueden resultar en cuatro aspectos: 1) que la enzima inicial convierta el sustrato en un producto que no funcione como sustrato para otras enzimas y por ende anule la producción de energía por el microorganismo, 2) que se requieran sustratos adicionales que lleven a cabo las diversas reacciones sucesivas, 3) que el sustrato inicial sea transformado en un producto inhibitor de los siguientes procesos enzimáticos que tienen como finalidad la mineralización y 4) que durante la transformación del xenobiótico se tengan productos que inhiban el crecimiento del organismo (Nápoles, 2005). Los cuatro aspectos son de gran importancia para poder hacer inferencias con base en este trabajo. A la concentración de 3.8 µg/L de BaP, la actividad enzimática disminuida podría estar indicando que el BaP fue transformado en un producto inhibitor generado durante su procesamiento inicial.

El citocromo P450, dependiente de reacciones de monooxigenasa en el metabolismo y oxidación de moléculas xenobióticas, está involucrado tanto en la detoxificación como en la activación de derivados tóxicos de HPA's (Stegeman, 1985). La disminución significativa observada a las 9 h de exposición al BaP, después de un incremento de actividad a las 6 h, sugiere la producción de metabolitos inhibidores del metabolismo durante la biotransformación del BaP. Es decir, estos cambios podrían estar indicando que a las 6 h se inicia un proceso de detoxificación, el cual activa o produce derivados tóxicos ocasionando la disminución que se observa en la NADPH cit P450 reductasa a las 9 h.

8. CONCLUSIONES

La concentración de 1.3 µg/L de BaP no tiene efecto sobre la actividad enzimática de NADPH cit P450 reductasa de la microalga *D. tertiolecta*.

La concentración de 3.8 µg/L de BaP tiene efecto sobre la actividad enzimática de NADPH cit P450 reductasa de la microalga *D. tertiolecta*.

La NADPH cit P450 reductasa es una enzima que forma parte inicial del metabolismo de BaP en *D. tertiolecta*, ya que su actividad es estimulada inicialmente cuando la concentración de BaP es 3.8 µg/L de BaP.

La actividad enzimática de NADPH cit P450 reductasa en la microalga *D. tertiolecta* se inhibe a las 9 h de exposición a 3.8 µg/L de BaP.

La concentración 0.037% V/V de acetonitrilo en el ensayo de exposición de 3.8 µg/L tiene efecto sobre la actividad de NADPH cit P450 reductasa al inicio de la exposición.

9. BIBLIOGRAFIA

Arredondo, B.O., B. Cordero y D. Voltolina. 2007. Determinación de proteínas por métodos espectrofotométricos. En: B.O. Arredondo y D. Voltolina (eds.). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, B.C.S. México. 31-39 p.

Avron, M. 1992. Osmoregulation. In: M. Avron and A. Ben-Amotz (eds.). *Dunaliella: Physiology, Biochemistry and Biotechnology*. Boca Raton: CRC Press. 135-159 p.

Bauer, J.E. and D.G. Capone. 1988. Effects of co-occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 1649-1655 p.

Belle, A.J. 2007. Laboratory evaluation of *Dunaliella tertiolecta* as a candidate algal species for tertiary wastewater treatment of nitrogen and phosphorus-laden effluents impacting marine environments. MSc. Thesis, Louisiana State University, Baton Rouge, LA. 68 pp.

Beller, H.R. and A.M. Spormann. 1998. Analysis of the novel benzylsuccinate synthase reaction for anaerobic toluene activation based on structural studies of the product. *Journal of Bacteriology*. 180: 5454-5457 p.

Ben-Amotz, A. 1993. Production of β - carotene and vitamin by the halotolerant algae *Dunaliella*. In: A. Ahaway and O. Zabrosky (eds.). Marine Biotechnology. Plenum Press. New York. 411-417 p.

Ben-Amotz, A. and M. Avron. 1990. The biotechnology of cultivating of the halotolerant alga *Dunaliella*. Tibtech. 8: 121-126 p.

Botello, A.V., J. Rendón von Osten, G. Gold y C. Agraz. 2005. Golfo de México Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias. Segunda edición. Universidad Autónoma de Tabasco. México. 695 pp.

Bucheli, T.D. y K. Fent. 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker of environmental contamination in aquatic ecosystems. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 25(3): 201-268 p.

Canet, R., J.G. Birnstingl, D.G. Malcolm, J.M. Lopez-Real y A.J. Beck. 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. Bioresource Technology. 76(2): 113-117 p.

Castillo, F. y M.D. Roldán. 2005. Biotecnología ambiental. Editorial TÉBAR, S. L. Madrid. 614 pp.

CEPA (Canadian Environmental Protection Act). 1994. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Environmental Canada and Health. Ontario, Canada. 214 pp.

Cerniglia, E.C., C. Van Baalen and T.D. Gibson. 1980. Metabolism of naphthalene by the cyanobacterium *Oscillatoria* sp., strain JCM. *Journal of General Microbiology*. 116: 485-494 p.

Chan, S.M.N., Tiangang Luan, Ming Hung Wong and Nora Fung Yee Tam. 2006. Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25(7): 1772-1779 p.

Collier, T.K., B.F. Anulaci3n, J.E. Stein, A. Goksoyr and U. Varanasi. 1995. A field evaluation of cytochrome P4501A as a biomarker of contaminant exposure in three species of flat-fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 14: 143-152 p.

Donato, T. y J.E. O'Connor. 2004. M3todos de evaluaci3n del citocromo P450 y su papel en el metabolismo de f3rmacos. En: M. J. G3mez-Lech3n y M. Cascales (eds.). *Citocromo P450*. Real Academia de Farmacia. Madrid, 313-359 pp.

Eggens, M.L., A. Opperhuizer and J.P. Boon. 1996. Temporal variation of CYP450 A1 indices, PCB and 1OH-pyrene concentration in flounder, *Platichthys flesus*, from the Dutch Wadden Sea. *Chemosphere*. 33: 1579-1596 p.

Ellis, B.E. 1977. Degradation of phenolic compounds by freshwater algae. *Plant Science Letters*. 8: 213-216 p.

Feng, Xu. 2005. Applications of oxidoreductases: Recent Progress. *Industrial Biotechnology*. 8(1): 38-50 p.

Ferrera, R., N. Rojas, H.M. Poggi, A. Alarcón y R.O. Cañizares. 2006. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48(2): 179-187 p.

Garrigues, P., C. Raoux, P. Lemaire, D. Ribera, A. Mathieu, J.F. Narbonne and M. Lafaurie. 1990. In situ correlation between PAH and PAH-metabolizing system activities in mussels and fish in the Mediterranean Sea: Preliminary results. *International Journal of Analytical Chemistry*. 38: 379-387 p.

Gómez Gutiérrez, C.M. 2004. Evaluación de la inducción del citocromo P450 y la actividad de enzimas asociadas al metabolismo de los hidrocarburos policíclicos aromáticos en la anemona *Anthopleura elegantissima*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. B. C., México. 70 pp.

Guerra Rivas, G. 2003. Biocatalizadores y biomarcadores moleculares de organismos marinos. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. B. C., México. 180 pp.

Hahn, A. and B. Hock. 1999. Assessment of DNA damage in filamentous fungi by single cell gel electrophoresis, comet assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18(7): 1411-1424 p.

Heffernan, L.M. and G.W. Winston. 1998. Spectral analysis and catalytic activities of the microsomal mixed function oxidase system of the sea anemone (phylum: Cnidaria). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 121(C): 371-383 p.

Juhasz, L.A. and R. Naidu. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Intern. Biodeter. Biodegr.* 45: 57-88 p.

Kirso, U. and N. Irha. 1998. Role of algae in fate of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *Ecotoxicology Environmental Safety.* 41(1): 83-89 p.

Leahy, J.G. and R.R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environmental. *Microbiological Reviews.* 54: 305-315 p.

Leaver, M.J. 1996. *Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, molecular and cellular approaches.* E. W. Taylor (ed.). Cambridge University Press. 267-278 p.

Lee, R.E. 1999. *Phycology.* Third edition. Cambridge University Press. Cambridge. 614 pp.

Lei, A.P., Y.S. Wong and N.F.Y. Tam. 2002. Removal of pyrene by different microalgal species. *Water Science and Technology.* 46: 195-201 p.

Lei, A.P., Y.S. Wong and N.F.Y. Tam. 2003. Pyrene induced changes of glutathione-S-transferase activities in different microalgal species. *Chemosphere.* 50: 293-301 p.

Lei, A.P., Y.S. Wong and N.F.Y. Tam. 2007. Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. *Bioresource Technology.* 98(2): 273-280 p.

Livingstone, D.R., P. García Martínez, X. Michel, J.F. Narbonne, S. O'Hara, D. Ribera and G.W. Winston. 1990. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel *Mytilus edulis* and other molluscs. *Functional Ecology*. 4: 415-424 p.

Livingstone, D.R. 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 57: 195-211 p.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275 p.

Madigan, M., J. Martinko y J. Parker. 2004. *Biología de los microorganismos*. Décima edición. Prentice Hall Iberia. Madrid. 986 pp.

Maier, R.,I. Pepper and C. Gerba. 2000. Microorganims and organic pollutants. In: *Environmental Microbiology*. Academic Press. Canada. 363-400 p.

Marnett, L.J. and M.A. Tuttle. 1980. Comparison of the mutagenicities of malondialdehyde and side products formed during its chemical synthesis. *Cancer Research*. 40: 276-282 p.

Morgenstern, R., J.W. DePierre, C. Lind, C. Guthenberg, B. Mannervik and L. Ernster. 1981. Benzo(a)pyrene quinones can be generated by lipid peroxidation and are conjugated with glutathione S-transferase B from rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 99: 682-690 p.

Nakamura, M and T. Hayashi. 1994. One- and two-electron reduction of quinones by rat liver subcellular fractions. *Journal of Biochemistry*. 115: 1141-1147 p.

Nápoles Álvarez, J. 2005. Ensayos de tratabilidad en suelos contaminados con petróleo. Tesis de Maestría. Mención Ambiental. Universidad de Oriente. Cuba. 50 pp.

Narro, L.M., E.C. Cerniglia, C. Van Baalen and T.D. Gibson. 1992. Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 1351-1359 p.

NIWA, 1998. Marine algae *Dunaliella tertiolecta* chronic toxicity test protocol (MFE 80205: Appendix 1). Ecotoxicology Laboratory, New Zealand. 53 pp.

Núñez, R. 2003. Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos. Tesis Doctoral. Universidad de La Habana. Cuba.

Pieper, D. and W. Reineke. 2000. Engineering bacteria for bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. 11: 262-270 p.

Pirszel, J., B. Pawlik and T. Skowroński. 1995. Cation-exchanged capacity of algae and cyanobacteria: a parameter of their metal sorption abilities. *Journal of Industrial Microbiology*. 14: 319-322 p.

Pflugmacher, S. and H. Sandermann. 1998. Cytochrome P450 monooxygenases for fatty acids and xenobiotics in marine macroalgae. *Plant Physiology*. 117(1): 123-128 p.

Pflugmacher, S., C. Wiencke, C. and H. Sandermann. 1999. Activity of phase I and phase II detoxification enzymes in Antarctic and Arctic macroalgae. *Marine Environmental Research*. 48: 23-36 p.

Radwan, S.S. and H.R. Al-Hasan. 2000. Oil pollution and cyanobacteria. In: B. A. Whitton and M. Potts (eds.). *The ecology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 307-319 p.

Raucy, J.L. and S.W. Allen. 2001. Recent advances in P450 research. *Pharmacogenomics Journal*. 1: 178-186 p.

Rausch, T. 1981. The estimation of microalgal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass. I. Comparison of methods for extracting protein. *Hydrobiologia*. 78: 237-251 p.

Roy, N. K., G.L. Kremer, B. Konkle, C. Grunwald and I. Wirgin. 1995. Characterization and prevalence of a polymorphism in the 38 untranslated region of cytochrome P4501A1 in cancerprone Atlantic tomcod. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 322(1): 204-213 p.

Segovia, M., L. Haramaty, J.A. Berges and P.G. Falkowski. 2003. Cell death in the unicellular chlorophyte *Dunaliella tertiolecta*. A hypothesis on the evolution of apoptosis in higher plants and metazoans. *Plant Physiology*. 132: 99-105 p.

Semple, K.T., R.B. Cain and S. Schmidt. 1999. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiology Letters*. 170: 291-300 p.

Shariati, M. and R.McC. Lilley. 1994. Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by electroporation at constant osmotic pressure: subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes. *Plant and Cell Environment*. 17: 1295-1304 p.

Singh, A. and O. Ward. 2004. *Applied bioremediation and phytoremediation*. Springer Verlag. Serie of Soil Biology. 281 pp

Sloan, N. 1981. Enzymic hydroxylation of benzo[a]pyrene at the 6- position by vitamin K1 hydroperoxide and rat lung hydroperoxidase. *Xenobiotica*. 1: 267-274 p.

Spain, J.C., P.H. Pritchard and A.W. Bourquin. 1980. Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 40: 726-734 p.

Spain, J.C. and P.A. van Veld. 1983. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure. *Applied and Environmental Microbiology*. 45: 428-435 p.

Stegeman, J.J. 1985. Benzo(a)pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel *Mytilus edulis* and other bivalve mollusc species from the Western North Atlantic. *Marine Biology*. 89: 21-30 p.

Stegeman, J.J., B.R. Woodin and R.L. Binder. 1984. Patterns of benzo[a]pyrene metabolism by varied species, organs and developmental stages of fish. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 65: 371-377 p.

Stringfellow, W.T. and M.D. Aitken. 1995. Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes and fluorine by phenanthrene-degrading pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 357-362 p.

Tam, N.F.Y., C.L. Guo, W.Y. Yau and Y.S. Wong. 2002. Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*. 45: 316-324 p.

Tang, J., B.D. Siegfried and K.D. Hoagland. 1998. Glutathione-S-transferase and in vitro metabolism of atrazine in freshwater algae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 59: 155-161 p.

Tang, L., X.Y. Tang, Y.G. Zhu, M.H. Zheng and Q.L. Miao. 2005. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban soils in Beijing, China. *Environment International*. 31: 822-828 p.

U.S. EPA. 1996. *Bioremediation of Hazardous Waste Sites: Practical Approaches to Implementation*. EPA/625/K-96/001. 232 pp.

US NCR, 1989. *Biologic markers in reproductive toxicology*. National Academic Press. US National Research Council. Washington D.C.

Van Brummelen, T.A., B. van Hattum, T. Crommentuijn and D.F. Kalf. 1998. Bioavailability and ecotoxicity of PAHs. In: A. Neilson and O. Hutzinger (eds.). *PAHs and Related Compounds. The Handbook of Environmental Chemistry. Part J*. Springer Verlag. 3: 203-263 p.

Viñas, M., J. Sabaté, M. Grifoll y A.M. Solanas. 2001. Ensayos de tratabilidad en la recuperación de suelos contaminados por la tecnología de la biorremediación. Residuos. Revista técnica. 59: 78-82 p.

Walker, D.J., R.R. Colwell and L. Petrakis. 1975. Degradation of petroleum by an alga, *Prototheca zopfii*. Applied Microbiology. 30: 79-81 p.

Warshawsky, D., T. Cody, M. Radike, R. Reilman, B. Schumann, K. Ladow and J. Schneider. 1995. Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. Chemicol-Biological Interactions. 97: 131-148 p.

Yang, S., R.S.S. Wu and R.Y.C. Kong. 2002. Biodegradation and enzymatic responses in the marine diatom *Skeletonema costatum* upon exposure to 2,4-dichlorophenol. Aquatic Toxicology. 59: 191-200 p.

Zar, J.H. 1999. Biostatistical Analysis. Fourth edition. Prentice Hall. 929 pp.

Zazueta, R. 2008. Oxigenasa paso inicial en la biodegradación de hidrocarburos por la cepa YR-1 de *Mucor circinelloides*. En: Las oxidorreductasas en la biotecnología ambiental. CONCYTEG. Año 3. 37: 37-49 p.