

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Sección de Biológicas.



TESIS DOCTORAL

**Modificaciones de la ultraestructura del género
chlamydomonas oblonga provocadas experimentalmente por
la acción de herbicidas y detergentes : tesis doctoral**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Esperanza Díaz Miguel

Madrid, 2015

BIBLIOTECA UCM



5304816095

D 593.1
DIA
mod.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Serie A - n.º 166

SECCION DE BIOLOGICAS

**MODIFICACIONES DE LA ULTRAESTRUCTURA
DEL GENERO CHLAMYDOMONAS OBLONGA
PROVOCADAS EXPERIMENTALMENTE POR LA
ACCION DE HERBICIDAS Y DETERGENTES**

TESIS DOCTORAL

por

ESPERANZA DIAZ MIGUEL



R. - 19.411

Publicaciones de la Facultad de Ciencias

MADRID, 1972

X530175494

A la memoria de mis padres
A mi marido e hijos

PREFACIO

El presente trabajo, iniciado en 1968, fue realizado en los Laboratorios de la Cátedra de Bacteriología y Protozoología de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Madrid, bajo la dirección del Catedrático Profesor D. DIMAS FERNANDEZ-GALIANO.

A él se debe, por sus doctas enseñanzas y su incondicional orientación, cuanto de bueno pueda contener este trabajo. Creo un deber de elemental cortesía expresarle aquí mi público agradecimiento.

Palabras también de sincero reconocimiento al Profesor BUSTINZA quien, desde que iniciara estos estudios, me ofreció no sólo su consejo y valiosa cooperación sino que permitió, en su Departamento de Fisiología Vegetal, bajo la dirección del Profesor Agregado D. CARLOS VICENTE CORDOBA y Dra. MANSO, llevar a cabo las experiencias y trabajos de esta investigación.

El desarrollo de esta Tesis no hubiese sido posible sin la eficaz orientación y apoyo moral del Profesor Agregado de Histología y Secretario del Instituto Cajal, Dr. MARIN GIRON, así como la eficaz colaboración de su equipo de auxiliares femeninos, en Microscopía Electrónica, y a D. CARLOS RODRIGUEZ del Departamento Fotográfico.

Finalmente, no puedo olvidar a mis compañeros de Laboratorio, especialmente a los profesores adjuntos Dr. ARROYO, Dra. FLORES, Dra. MENDOZA, Sra. AGRA y Sr. FRYEIRO. Para todos ellos, en el mejor de los recuerdos de las horas de trabajo y estudio, sencillamente gracias.

INDICE

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCION	1
I.1. Filogenia del Género Chlamydomonas	1
I.2. Posición taxonómica	5
I.3. Descripción del Género Chlamydomonas ...	6
I.4. Resumen histórico de los estudios reali- zados sobre el Género Chlamydomonas	7
I.5. Elección y objeto del tema	12
II. MATERIAL	15
II.1. Estirpe elegida	15
II.2. Medios de cultivo	15
II.3. Aparatos	17
II.4. Productos	17
Herbicidas	18
Detergentes	19
III. METODOS	21
III.1. Cultivos	21
III.2. Recta patrón	21
III.3. Determinación del crecimiento celular ..	21
III.4. Estudio de los pigmentos contenidos en Chlamydomonas oblonga	22
III.5. Microscopía electrónica	23
III.6. Método para detectar el efecto de herbi- cidas y detergentes sobre la fase lumíni- ca de la fotosíntesis sobre Chlamydomo- nas oblonga	27

	<u>Página</u>
IV. ESQUEMA DEL TRABAJO PROPUESTO	29
V. PARTE EXPERIMENTAL	31
V.1. Estudios preliminares	31
V.2. Influencia de las distintas concentraciones de herbicidas y detergentes sobre el crecimiento de Chlamydomonas oblonga	32
V.3. Estudio de pigmentos	60
V.4. Ultraestructura de Chlamydomonas oblonga	74
V.5. Comprobación funcional de las modificaciones ultraestructurales encontradas por microscopía electrónica	215
VI. CONCLUSIONES	229
VII. BIBLIOGRAFIA	235

I. INTRODUCCION

I.1. FILOGENIA DEL GENERO CHLAMYDOMONAS

Antes de abordar el trabajo de investigación, trataremos de enmarcar filogenética y taxonómicamente al género Chlamydomonas dentro del Phylum Protozoos.

El sistema natural de la clasificación de los Protozoos, lo mismo que cualquier otro grupo de seres, estaría basado en las relaciones filogenéticas entre ellos, de conformidad con la doctrina de que los organismos actuales han descendido de formas ancestrales primitivas a través de una evolución orgánica.

En el caso de los Protozoos, la historia evolutiva se resiente de escasez de restos fósiles que tanto han contribuido a resolver los problemas filogenéticos en otros grupos zoológicos.

Salvo en los Foraminíferos y Radiolarios, dotados de estructuras esqueléticas de naturaleza inorgánica que representan una pequeña proporción en el conjunto de los Protozoos y que se conservan como fósiles, los demás no dejan restos. Sin embargo, la Paleontología ha proporcionado en algunos de los grupos que no dejaron huella en los estratos, una serie de datos que indirectamente han contribuido a esclarecer la historia evolutiva de ciertos Protozoos parásitos, cuya filogenia se puede reconstruir gracias al conocimiento de los fósiles de sus hospedadores. Así DOGIEL en 1947, apoyándose en la especificidad más o menos estrecha de los entodiniomorfos de la familia Ophryoscolecidae con respecto a los rumiantes que los albergan y de los que se

conoce su historia evolutiva, ha podido establecer, que los ciliados de esta familia aparecieron desde el Eoceno hasta el Plioceno, correspondiéndose la aparición de los diversos géneros, con los distintos pisos intermedios.

Por otra parte, el estudio de las formas vivientes, proporciona datos de inestimable interés respecto a la morfología, fisiología y desarrollo, para formar conceptos claros sobre las relaciones filéticas de los distintos grupos de Protozoos.

La persistencia de ciertas características de un grupo en determinadas fases del ciclo biológico de otros grupos, ha hecho posible la enunciación de una serie de hipótesis sobre el origen filogenético de estos últimos.

Posteriormente, el Prof. FERNANDEZ GALIANO (1969), modificando la sistematización de los fenómenos de convergencia señalados por el Prof. DOGIEL (1965), distingue los siguientes casos de convergencia:

- 1º) Convergencia entre Protozoos y células de Metazoos.
- 2º) Convergencia entre orgánulos de Protozoos y formaciones en células de Metazoos.
- 3º) Convergencia entre orgánulos de Protozoos y estructuras de origen pluricelular en Metazoos.
- 4º) Convergencia entre Protozoos y Metazoos completos.

En la evolución de los Protozoos pueden observarse tres tendencias cuya relación será distinta según el grupo de que se trate, a saber:

- 1º) Una evolución citológica, tendiendo a una complicación estructural de su única célula.
- 2º) Una polimerización, es decir, multiplicación en número y algunos orgánulos extraordinariamente diferenciados.
- 3º) Consecuentemente a la anterior, existe la tendencia hacia los estadios pluricelulares bien por la polimerización de las dotaciones genéticas completas de la célula, o bien de la totalidad de éstas, llegando con ello a los estadios coloniales, propiamente dichos.

La plena solidaridad entre los individuos de una colonia, constituyendo una auténtica unidad funcional biológica, se alcanza en el orden Volvocidae en el que se pueden seguir varias líneas evolutivas en las que paulatinamente se va perfilando mayor intimidad entre los miembros de la colonia y la especialización entre soma y germen.

Al propio tiempo, en muchos de estos flagelados, la colonia ostenta un número fijo de células que aparecen a partir de la célula original, mediante una auténtica ontogenia colonial, invariable para cada especie.

Prácticamente en todos los flagelados, se aprecia una tendencia hacia la formación de colonias o formas pluricelulares, mucho más clara en volvocidos, en los que la línea evolutiva es terminal, aunque en otros grupos de flagelados vegetales, como los Chrisomonadinos, la tendencia hacia las formas pluricelulares conduce a la aparición de distintos grupos de algas, organismos que no pueden ser considerados como Protozoos, aunque derivan filogenéticamente de éstos. Es en este grupo, donde con mayor agudeza se presenta el problema de la delimitación de los Protozoos como tales, por ser demasiado gradual el tránsito de flagelados a algas, para hallar un límite preciso entre ambos grupos.

Para separarlos taxonómicamente, puede seguirse el criterio que los filogenetistas vegetales llaman nematización, que resulta de la orientación paralela de los sucesivos planos de división en el desarrollo ontogenético de una colonia, dando un filamento. Si los planos no son paralelos, la colonia resultante será plana o tridimensional y se podrá considerar, como el estadio colonial de una especie protozoológica; si los planos de escisión son todos paralelos, el filamento resultante de la escisión de la célula primera será un filamento algal.

Ahora bien, la evolución hacia las algas se puede realizar sin que tenga lugar la nematización, originándose talos no filamentosos, en cuyo caso las algas son como estadios palmeloides estabilizados.

Particularizando en la filogenia de los Protozoos, se nos presentan varias interrogantes. La primera es considerar si los Protozoos constituyen un verdadero Phylum; la segunda, ver de donde derivan filogenéticamente; la tercera, sus relaciones filogenéticas mutuas y la cuarta, su relación con Metazoos y plantas.

Las respuestas a estos interrogantes no son absolutamente contundentes y los autores manifiestan muchas opiniones que no es lugar éste de discutir.

* * *

Desde CHATTON y LWOFF. (1936), los organismos se dividen en protocariontes y eucariontes, según la ausencia o presencia del núcleo típico, con membrana nuclear y cromosomas claramente distintos.

Por otra parte, desde el punto de vista fisiológico, primero existirían los organismos holofíticos que vivirían de materia inorgánica, les seguirían los holozoicos que viven del substrato orgánico. Por tanto, el grupo de los Mastigóforos, que incluye un gran número de formas con clorofila, se debe considerar como más primitivo que los sarcodinos holozoicos.

De los mastigóforos, los fitomastigóforos deben ser considerados por lo mismo más primitivos que los zoomastigóforos.

Según PASCHER, SCHERFFEL y otros, los crisomonadinos parecen ser los más cercanos a los ancestrales, de los cuales se originaron otros grupos de fitomastigios.

Entre los zoomastigios, los rizomastigios dieron origen posiblemente a los protomonádidos de los que se originaron posteriormente los polimastigios e hipermastigios, que son los más avanzados de los mastigóforos, siendo su carácter más importante, el gran número de flagelos.

Los zoomastigios originarían a los Sarcodinos.

Es bastante claro que los flagelados han dado origen a

los diferentes troncos de algas.

I.2. POSICION TAXONOMICA

Pasaremos primeramente revista a la posición taxonómica, precisamente por los problemas planteados en la filogenia de los Protozoos, del género Chlamydomonas en los diversos autores, tanto botánicos como zoólogos.

En la Botánica Sistemática de WETTSTEIN aparece de la siguiente manera:

Phylum Eutalophyta
Clase Chlorophyceae "algas verdes"
Orden Volvocales
Familia Chlamydomonadaceae

En la sistemática propuesta por PIERRE GRASSE para los Protozoos en su "Traité de Zoologie", Tome I, 1^{er} fascículo, altamente revolucionaria (1954):

Phylum Protozoa (GOLDFUSS, 1817; SIEBOLD, 1848)
Superclase .. Flagellata
Clase Phytomonadines o Volvocales (FRANCE, 1894;
BLOCHMANN, 1895)
Familia Chlamydomonadidae (COLLINS, 1907)
Género Chlamydomonas (EHRENBERG, 1838)

En el tratado de Zoología de R.R. KUDO, 1954:

Phylum Protozoa (GOLDFUSS)
Subphylum ... Plasmodroma (DOFLEIN)
Clase Mastigófora (DIESIG)
Subclase Phytomastigia (DOFLEIN)
Orden Phytomonadida (BLOCHMANN)
Familia Chlamydomonadidae (BÜTSCHLI)

Finalmente, en la clasificación de los Protozoos por el Comité de Taxonomía y problemas taxonómicos de la "Society of Protozoologists", publicada en el "Journal of Protozoology, 11, 1964" nos da para el Género que nos ocupa la siguiente posición sistemática:

Subtronco ...	Sarcomastigófora
Subclase	Mastigófora
Clase	Phytomastigoforea
Orden	Volvócida
Familia	Chlamydomonadidae
Género	Chlamydomonas

I.3. DESCRIPCION DEL GENERO CHLAMYDOMONAS

Protista eucarionte, clasificado entre las algas como cloroficea y como flagelado entre los Protozoos primitivos. Su dual clasificación se debe a que tiene un orgánulo celular típico de las plantas "el cloroplasto", embebido en una organización similar al citoplasma animal, como se coelige de la monografía realizada por GERLOFF (1940).

Al microscopio óptico presenta forma ovoide cuyo diámetro en la fase logarítmica de crecimiento es de $6 \times 8 \mu$ y cada célula está envuelta por una membrana plasmática, rodeada por una pared celulósica y exteriormente a ella una cápsula conteniendo polisacáridos, que difunde al medio en las formas móviles, mientras que en las no móviles se acumula a su alrededor en considerable espesor.

Las dos terceras partes del citoplasma posterior contienen un orgánulo verde en forma de copa que es el cloroplasto, en cuyo interior hay un pirenoide de 2μ aproximadamente, esférico y rodeado por un número de láminas conteniendo almidón. El pirenoide propiamente, tiene una estructura al microscopio electrónico que se discutirá más adelante; contenga o no clorofila, es observable, ya que está rodeado por el material verde del cloroplasto.

El almidón está localizado en dos regiones. Una primera, en las placas que rodean al pirenoide, en forma de gruesos gránulos esparcidos a través del cloroplasto. En ciertas condiciones estos gránulos pueden llegar a ser tan grandes que distiendan al plasto e incluso a la célula completa. El estigma permanece dentro del cloroplasto, en su ángulo anterior contra la pared celular, a la cual evagina como una

gruesa prominencia.

En el tercio anterior está al núcleo, dos vacuolas contráctiles y dos flagelos de 10 μ de longitud aproximadamente.

I.4. RESUMEN HISTORICO DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE EL GENERO CHLAMYDOMONAS

Tras la descripción de numerosas especies por autores diversos a lo largo del siglo XIX, reseñaremos algunas de las investigaciones llevadas a cabo durante el siglo XX.

1903 HOLMES en el Género Volvox y MAST en el Género Chlamydomonas, Euglena y Volvox, estudia los cambios de velocidad en el crecimiento debidos a cambios en la intensidad luminosa, con que han sido cultivados.

1916 PASCHER: cruzó diferentes especies de Chlamydomonas, mostrando caracteres parenterales por segregación mendeliana en la descendencia, apareciendo en la F_1 en la proporción de 2:2, todos ellos haploides.

1929 KARTER: estudia la morfología y división en Chlamydomonas, haciendo referencia a la filogenia de los flagelados y su sistema neuromotor.

1932 LUCKSCH: describe siete especies de Chlamydomonas, de las cuales cinco crecieron en la obscuridad en medio, conteniendo peptona o acetato, y dos no. Del mismo modo observó en Chlamydomonas agloeiformis, que era incapaz de usar nitratos como fuente de nitrógeno en la obscuridad.

- 1933 MOEWUS y colaboradores: publican 25 artículos sobre fenómenos de sexualidad en distintos grupos de Chlamydomonas.

1935 GERLOFF: describe una nueva especie de Chlamydomonas aislada por Czurda, "Chlamydomonas moewusii", diferente de la Chlamydomonas spagnophyla por tener una membrana papilosa que no existía en las otras.

En el mismo año, FRITSCH estudia la estructura y reproducción en Chlamydomonas.

1937 BRECHOT: alude a un mutante incoloro de Chlamydomonas afirmando que el almidón libera glucosa caracterizada por la fenilosazona.

1940 MOEWUS: hace estudios comparativos en los ciclos reproductores de las especies moewusii y eugametos.

1948 SMITH: estudia el crecimiento de Chlamydomonas reinhardtii en la obscuridad en medios conteniendo acetatos. Al someterlas a luz blanca y después retirarlas a la obscuridad durante una semana, los cultivos producían células funcionalmente sexuales y móviles, mientras que sin haber sido tratados previamente con iluminación, producían células móviles pero no funcionales sexualmente. Si crecían en luz azul o roja, recuperaban su función sexual y su motilidad.

LEWIN: obtiene individuos sexualmente activos de Chlamydomonas moewusii previamente cultivados en agar de 2 a 5 días, señalando la necesidad del control de la luz para el desarrollo del cigoto.

1949 BOLD: señala el requerimiento en el medio, de extracto del suelo, vitamina B-12, histidina y ácido aspártico para un mejor metabolismo de Chlamydomonas.

FRANK: detecta la acumulación de productos ácidos en la respiración de Chlamydomonas moewusii y PRANKEL, marca la reducción del CO_2 por el H_2 en la misma especie.

1951 HUTNER y PROVASOLI: comprobaron que Chilomonas, Polytomella y Chlamydomonas agloeiformis, eran resistentes ordinariamente a altas concentraciones de ácidos grasos y alcoholes (butanol, exanol).

1953 LEWIN: estudia la herencia en Chlamydomonas moewusii, y en 1954 en colaboración con BROKAW, describen un mutante de Chlamydomonas moewusii con paralización flagelar

conteniendo ATP-asa activa en la parte más baja del flagelo.

SAGER y GRANICK: estudian el apareamiento en el Género Chlamydomonas, afirmando que se produce entre células distintas (+ y -), previamente diferenciadas en gametos al menos fisiológicamente.

1954 SAGER: obtiene un mutante resistente a la estreptomicina.

FÖRSTER y WIESSE aislaron gamonas en Chlamydomonas eugametos de elevado peso molecular, cuya composición podría ser "sulfato-glucoproteína".

1955 HARTMANN: lanza la hipótesis de que estas gamonas son gluco proteínas.

1956 FÖRSTER y colaboradores: informan sobre la formación de glucoproteínas de alto peso molecular, por gametos de distintas especies de Chlamydomonas, de lo que coe-lige su carácter sexual.

1957 SAGER y PALADE: estudian la estructura y desarrollo del Cloroplasto en Chlamydomonas reinhardi. Sugieren que la unidad estructural básica de los cloroplastos son los discos,

1958 GIBBS, LEWIN y PHILPOTT: estudian la ultraestructura del aparato flagelar en Chlamydomonas moewusii.

1959 BUFFALOE, SAGER, LEWIN y FOLSON: por medio del microscopio óptico y con preparaciones de Chlamydomonas aplastadas y teñidas por el reactivo de FEULGEN, muestran los cromosomas de distintas especies de Chlamydomonas, llegando a la conclusión que su número haploide es ocho.

HAGEN, SYFFERTH: estudian la quimiotaxis en Chlamydomonas eugametos, marcando sus diferencias con respecto a la especie moewusii.

1960 JONES, TIBBS y LEWIN: prueban que los componentes ciliares del Género Tetrahymena son similares a los fla-

gelos de Chlamydomonas.

PROVASOLI: hace destacar que entre los flagelados que no requieren tiamina aparentemente, están Chlamydomonas moewusii y Cryptomonas ovata "fotosintéticas", mientras que otros mutantes de Chlamydomonas precisan nicotinamida.

RONKIN y BURETZ: siguen el movimiento del Na^{24} y K^{42} en Chlamydomonas moewusii. Del sodio intracelular total, sólo el 1,3% aparecía marcado. Mientras que del K intracelular había una penetración del 28%.

BROKAW: estudia la activación del flagelo paralizado de un mutante de Chlamydomonas moewusii, mediante adenosintrifosfato. Examinando la naturaleza química de los flagelos de Chlamydomonas moewusii vieron que era:

60-65% proteína.

6-8% carbohidrato.

27-34% lípidos.

1961 KERR: prueba la inhibición de la formación de los flagelos por la acción de la estreptomycin.

TSUBO: detecta la presencia de productos volátiles entre ellos CO , CO_2 , poco efectivos, y etano y etanol mucho más efectivos, producidos por los gametos de tal modo, que los de signo positivo son atraídos por los de signo negativo y siempre en esa dirección, de lo que se deduce la estrecha relación entre la quimiotaxis y la sexualidad.

1962 LEVINE y EBERSOLD: estudian el control de la herencia celular en Chlamydomonas.

CRISTOFALO: señala que la liberación de las células hijas por la célula madre, se retrasa hasta dos horas en la transición luz-obscuridad.

RIS y PLAUT: publican un trabajo sobre la ultraestructura del ADN contenido en áreas del Cloroplasto de Chlamydomonas.

HACK y colaboradores: encuentran entre los lípidos de

Chlamydomonas spagnophila los tipos siguientes: neutros, glucolípidos, fosfatidiletanolamina fosfatidilglicerol y fosfatidilcolina, pero no plasmalógenos.

1963 ERWIN y BLOCH: vieron que el ácido α -linolénico es el de mayor tanto por ciento en muchos microorganismos incluida Chlamydomonas reinhardi, tras estudiar en 1962 el efecto de la luz en la composición de los ácidos grasos de la cepa silvestre de esta especie y un mutante que producía poca clorofila en la oscuridad. Dicho tanto por ciento decrece pronunciadamente en células verdes sometidas a la oscuridad. Mientras que en la forma silvestre se mantiene la pigmentación verde en la oscuridad, lo que prueba la existencia de algún ácido graso tanto en las formas iluminadas como en las no iluminadas.

SAGER e ISHIDA: afirman que el proceso de diferenciación de los gametos en Chlamydomonas reinhardi es molecular, no morfogenético, requiriendo un régimen de escasez en N para provocar un bloqueo en la duplicación del ADN.

1964 EBERSOLD y GILLHAM: estudian la acción de una digestión enzimática de las membranas celulares para la fusión de los gametos, dando cigotos en los que se bloquea la mitosis, originando formas persistentes diploides.

HAIGH y BEEVERS: demuestran la presencia de isocitrato-liase en Chlamydomonas dysosmos.

RANDALL, WARR, HOPKINS y MC. VITTIE: detectan un gen mutante de Chlamydomonas reinhardi, que afecta a su motilidad mediante determinaciones genéticas ultraestructurales.

JINKS: estudia la herencia extracromosómica en Chlamydomonas.

1965 PIMENOVA y KONDRATEVA: precisan que el acetato es el mejor hidrato de carbono para el crecimiento de Chlamy-

domonas globosa, tanto a la luz como a la oscuridad.

1969 IWAMURA y KIWASHIMA: comprueban la presencia de DNA en regiones del cloroplasto usando CsCl, encontrando una proporción de 33 a 36% de Guanina-citosina.

GEODENOUGH, ARMSTRONG y LEVINE: describen en el mutante (ac-31) de Chlamydomonas reinhardi la presencia de membranas thylakoidales con su correspondiente actividad fotosintética.

1970 SCHOR, SIEKEVITZ y PALADE: describen estas mismas membranas en la forma silvestre de Chlamydomonas reinhardi.

FLETCHER, KIRKWOOD y SMITH: investigan los efectos de ciertos herbicidas sobre el crecimiento de Chlamydomonas globosa.

CALAVIER y SMITH: evidencian por microscopía electrónica la fusión de cloroplastos en el cigoto de Chlamydomonas reinhardii.

1971 RODRIGUEZ LOPEZ: estudia los efectos de la actidiona sobre Chlamydomonas reinhardii, señalando, entre otras cosas, la formación de fosfatasa ácida a nivel de las vacuolas y membranas de cloroplasto, así como la vacuolización de organelas celulares.

1.5. ELECCION Y OBJETO DEL TEMA

El Género Chlamydomonas, del que se han descrito más de 61 especies (según figura en el Catálogo de Cultivos de la Escuela Botánica de Cambridge), ha sido estudiado por los diversos autores bajo distintos puntos de vista, principalmente, en el aspecto morfológico, metabólico y sexual.

En principio, traté de encontrar las condiciones más favorables para el desarrollo del ciclo biológico de la especie elegida "Chlamydomonas oblonga".

Basándome en los conocimientos aportados por SAGER y PALADE, sobre la ultraestructura de Chlamydomonas reinhardii y tomándolos como punto de partida, he estudiado la acción

de sustancias diversas a diferentes concentraciones sobre su cloroplasto, para poder señalar los efectos que sobre su estructura producen. De todos los productos ensayados, he elegido la acción de los herbicidas y detergentes sobre este género, por ser menos conocida su acción y por pertenecer al Departamento de Microbiología, en cuya Sección de Microbiología del Suelo se estudian los problemas de interacción entre estas sustancias y los microorganismos en todas sus facetas.



II. MATERIAL

II.1. ESTIRPE ELEGIDA

Chlamydomonas oblonga, PRINGSHEIM (1930, Checoslovaquia) facilitada por el Departamento de "Culture Collection of Algae and Protozoa" de "The Botany School", Cambridge.

II.2. MEDIOS DE CULTIVO

1°) Medio Knop

Fosfato bipotásico	0,25 g
Nitrato cálcico	1,00 g
Sulfato magnésico	0,50 g
Sulfato férrico	trazas
Agua destilada	1,00 l

2°) Medio de Von der Crone

Nitrato potásico	1,00 g
Sulfato cálcico	0,50 g
Fosfato cálcico	0,25 g
Sulfato magnésico	0,50 g
Fosfato férrico	0,25 g
Agua destilada	1,00 l

3°) Medio de Knop enriquecido

Sulfato amónico	0,05 g
Sulfato magnésico	0,02 g
Cloruro cálcico	0,01 g
Fosfato monopotásico	1,40 g

Fosfato bipotásico 0,70 g
Solución de oligoelementos ... 1,00 ml
Agua destilada 1,00 l

4°) Medio de Proteosa-Peptona

Bacto-peptona 1,00 g
Nitrato potásico 0,12 g
Fosfato monopotásico 0,04 g
Sulfato magnésico 0,04 g
Extracto de tierra 4,00 ml
Agua desionizada 1,00 l

NOTA.- El extracto puede sustituirse por 4 cc de oligoelementos o por la misma cantidad de extracto de suelo (2 de oligoelementos: 1 de Winogradsky).

5°) Medio sólido de Proteosa-Peptona

Igual al anterior añadiendo 15 g de Bacto-Agar (Difco) por litro.

6°) Extracto de tierra

Tierra de jardín de pH neutro. 1,00 kg
Agua del grifo 1,00 l

Se mantiene la mezcla durante 1 hora en autoclave a 130°C, se deja escapar el vapor. Se filtra y tras repartir en tubos se esteriliza nuevamente.

7°) Solución de oligoelementos

Molibdato potásico 0,05 g
Borato de sodio 0,05 g
Nitrato de cobalto 0,05 g
Sulfato de cadmio 0,05 g
Sulfato de cobre 0,05 g
Sulfato de zinc 0,05 g
Sulfato de manganeso 0,05 g
Percloruro de hierro 1 gota
Agua destilada 1,00 l

8º) Solución salina de Winogradsky

Fosfato bipotásico	5,00 g
Sulfato magnésico	2,50 g
Cloruro sódico	2,50 g
Sulfato férrico	0,05 g
Agua destilada	1,00 l

II.3. APARATOS

- Los cultivos se incubaron en un equipo Psychotherm, con planta agitadora e iluminación de la casa New Brunswick Scientific.
- Determinaciones espectrofotométricas con Spectronic 20, de Bausch and Lomb, con cubetas de 1 cm de paso de luz.
- pHmetro Beckman, Expandomatic, para medidas de pH.
- Agitador de tubos Whirlimixer, HUCOA-ERLÖSS.
- Centrífuga Wifug modelo X-1 y centrífuga Sorvall, modelo RC-2B, para centrifugaciones de baja y alta velocidad.
- Las pesadas de precisión se llevaron a cabo en una balanza monoplato Monopan de Sauter y en balanza monoplato Sartorius, modelo 2442.
- Para las técnicas cromatográficas en capa fina, se usa el extendedor de placas Shandon R Unoplan y placas de vidrio de 20 x 20 cm; pipetas capilares y cubetas recubiertas interiormente por papel de filtro empapado en el disolvente utilizado.
- Ultramicrótopo Reichert, OM y LKB para cortes ultrafinos.
- Microscopio electrónico Zeiss, EM, 9a Philips y película plana Gevaert para observación de ultraestructuras.

II.4. PRODUCTOS

- Compuestos orgánicos de la casa Merck.
- Disolventes orgánicos de Merck y Fluka.
- Compuestos inorgánicos de Merck.
- Herbicidas:

1) *Diquat*.- Sal cuaternaria de biperidilo. 1,1-etileno-2,2-dibromodipiridilium. Soluble en agua. Punto de fusión entre 335-340°. Cristales amarillos. Utilizado como producto comercial conteniendo el 20% del producto activo, bajo el nombre de Reglone. Facilitado por Zeltia.

2) *Paraquat*.- Sal cuaternaria de dipiridilo. 1,1'-dimetil-4,4'-catión dipiridilo. Cristales amarillos, soluble en agua. Utilizado como producto comercial, conteniendo el 20% del producto activo, bajo el nombre de Gramoxone. Zeltia.

3) *Acido 2,4,5-Tricloro-fenoxiacético*.- Compuesto orgánico no nitrogenado derivado clorado, con el nombre comercial de Trioxone, que contiene el 50% del compuesto activo. Zeltia.

4) *Linuron*.- Derivado sintético de la urea. 3-(3,4-diclorofenil)-1-metoxi-1-metilurea. Conteniendo el 50% del producto activo, bajo el nombre comercial de Lorox. Zeltia.

5) *Diuron*.- Derivado sintético de la urea. 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea. Sólido cristalino. Punto de fusión 158-159°C. Utilizado como producto comercial conteniendo el 80% del producto activo, bajo el nombre de Karmex. Zeltia.

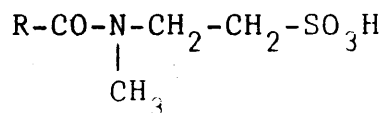
6) *Isocil*.- Derivado bromado. 5-bromo-3-sec-butil-6-metiluracil. Sólido cristalino. Punto de fusión 158-159°C. Utilizado como producto comercial conteniendo el 80% del producto activo, bajo el nombre de Hyvarx. Zeltia.

7) *Atrazina*.- Derivado de las triazinas. 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamina-s-triazina. Sólido. Prácticamente insoluble en agua. Soluble en alcohol. Utilizado como producto activo. Facilitado por Industrias Químicas de Navarra.

8) *Simazina*.- También derivada de la triazina. 2-cloro-4,6-bis(etilamina)-s-triazina. Sólido. Insoluble en agua, soluble en etanol, éter y cloroformo. Utilizado como producto activo. Facilitado por Industrias Químicas de Navarra.

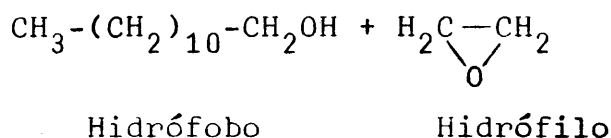
- Detergentes:

1) *Fenopon T 77*.- Tensioactivo aniónico. N-metil-oleil-taurida, de fórmula:

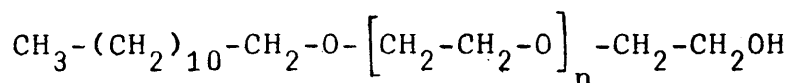


en la que R es un radical en el que predomina el grupo oleil.R.B.

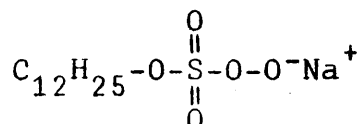
2) *DS. 4429*.- Es un condensado de dodecil alcohol con, aproximadamente, 9,5 moles de óxido de etileno. ICI.



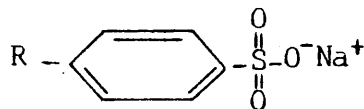
de fórmula general:



3) *S D S*.- Sodio-dodecil-sulfato (Lauril-sulfato de sodio), de fórmula:

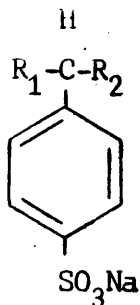


con unión probable de la cadena carbonada a un anillo bencénico de fórmula:



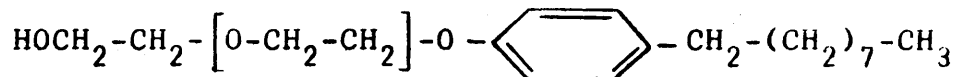
Sustancia orgánica y cadena ramificada empleada en la fabricación de detergentes comerciales. Es uno de los tensioactivos más extendidos. Koch Light.

4) *Dobane*.- Sodium sulfonato, de fórmula general:



en la que R₁ y R₂ son cadenas alquílicas, variando entre C₁₂ y C₁₅. La sustitución por núcleos bencénicos ocupa, aproximadamente, la posición 1-fenil. Shell.

5) *Lissapol SNXP*.- No iónico. Es un condensado de nonilfenol, de cadena esencialmente lineal, con, aproximadamente, 9,5 moles de óxido de etileno. ICI.



III. METODOS

III.1. CULTIVOS

Chlamydomonas oblonga (PRINGSHEIM), se mantuvieron en los medios de cultivo 1,2,3,4 y 5 a pH 6,5, en estufa Phsyco-therm a 28°C e iluminación constante, o bien a temperatura ambiente e iluminados por bujías de 100 vatios.

III.2. RECTA PATRON

Se construyó una recta de absorción frente a peso seco. Para ello se hicieron diluciones en potencia de dos, en los tubos de turbilimetría, midiendo a 900 m μ . Se centrifugaron las células a 6500 r.p.m. Decantado el medio, se lavaron 3 veces con cantidad suficiente de agua destilada y estéril y se secaron a 80°C.

Los pesos por ml de cultivo se enfrentaron a las absorbancias.

III.3. DETERMINACION DEL CRECIMIENTO CELULAR

Las células se cultivaron en cubetas especiales para Spec2Co (Tesis Doctoral del Dr. Vicente Córdoba, 1969).

La turbidez de los cultivos se medía en este aparato a una longitud de onda seleccionada para eliminar el pigmento de 900 m μ , equipando el fotocolorímetro con un filtro rojo.

Las curvas de crecimiento se representan en diagramas absorción-días.

III.4. ESTUDIO DE LOS PIGMENTOS CONTENIDOS EN CHL. OBLONGA

Se realizaron por cromatografía en capa fina y espectrofotometría.

- Cromatografía en capa fina.- Se utiliza como fase fija KIESELGEL Guach Stahl en agua destilada (10 g en 20 ml). Se extiende en capas de vidrio de 20 x 20 dando un espesor de 50 μ .

Como solventes se utilizan: Isopropanol más éter-petróleo (100-140°) y agua destilada en la proporción de 10 cc más 100 cc más 0,25 cc, respectivamente.

El día anterior se centrifugan los cultivos a 6500 r.p.m. durante 20 minutos. Se decanta y lava con tampón fosfatos de pH 6,9, centrifugando a 6500 r.p.m. durante 20 minutos y repitiendo la operación 2 veces más.

Tras decantar se añaden 4 ml de acetona Merck al 85%, manteniéndolos toda la noche en nevera.

Preparadas las placas de cromatografía, una vez marcados los frentes inicial y final, se colocan dos pipetas capilares de los pigmentos eluidos en acetona formando varias manchas en el frente inicial. Se introducen las placas en cubetas conteniendo el solvente tapadas y en la oscuridad durante 40 a 60 minutos en los que se alcanzará el frente de 15 a 16 cm final.

Finalmente, se retiran las placas y tras secarlas se separan raspando los distintos pigmentos que alcanzarán niveles diferentes, echándolos por separado en tubos de espectro conteniendo tampón fosfatos para medir la densidad óptica recorriendo la escala entre 375 y 900 m μ . Técnica de MARGARET HOLDEN (1962).

Siguiendo a EGON STAHL (1967), la cromatografía en capa fina la hemos utilizado para calcular los Rf de los distintos pigmentos, usando como fase fija, silicagel Guach Stahl de Merck y como solventes éter-petróleo y propanol en la proporción de 99:1. El frente final se marca a 16 cm. En este caso, se miden las longitudes alcanzadas por las distintas manchas y se calcula el Rf dividiendo estas

distancias por el frente final y multiplicando por 100. Estos resultados se confrontan con las tablas en las que se señala el pigmento a que corresponden.

- Espectrofotometría.- Lo mismo que en el caso anterior, se eluyen los pigmentos en acetona al 85% y se mantienen en nevera toda la noche.

Al día siguiente se mide el espectro recorriendo la escala en las longitudes de onda comprendidas entre 375 m μ y 700 m μ .

Los resultados se expresan en gráficas longitud de onda-D₀.

III.5. MICROSCOPIA ELECTRONICA

Teniendo en cuenta que las investigaciones sobre estructuras vivas realizadas con el microscopio electrónico, tienen unos especiales y complejos requerimientos en cuanto a las técnicas preparatorias, para después sacar partido del poder resolutivo y aumentos con dicho microscopio electrónico y conseguir los finos detalles morfológicos deseados, evitando las alteraciones por la acción de fijadores o fenómenos autolíticos postmortem, se someten las células directamente desde los cultivos al tratamiento de fijadores que no modifiquen prácticamente su estructura.

La técnica seguida por nosotros fue:

1) Fijación.

- Se centrifuga el medio conteniendo a las Chlamydomonas durante 10 minutos a 1500 r.p.m.
- Si de la primera centrifugación quedan bastantes células resuspendidas, se vuelven a centrifugar a 2500 r.p.m. durante 5 minutos.
- Se lavan en tampón Millonig y se tienen en él durante 30 minutos.
- Se centrifuga de nuevo en Sorvall y se le añaden 5 ml de tampón y 1 de glutaraldehído, que se preparan de la siguiente manera:

- Reactivos:

Glutaraldehído comercial del 50%. Se toman 1 cc + 16,6 cc de agua destilada.

Solución A: Fosfato monosódico al 2,26%.

Solución B: Hidróxido de sodio al 2,52%.

Solución C: Glucosa al 2,7%.

NOTA.- Las soluciones A y B se pueden guardar hasta 6 meses en nevera. La solución C es mejor prepararla en el momento para que no tenga gérmenes.

- Solución Millonig (tampón):

Solución A: 41,5 cc

Solución B: 8,5 cc

NOTA.- Esta solución debe dar un pH 7,3. De esta solución preparada se quitan 5 cc y se reemplazan por 5 cc de solución C. A todo esto se añaden 0,5 cc de Cl_2Ca al 1%, para preservar mejor las membranas.

- Se tienen en glutaraldehído a 0°C durante 2 horas.

2) *Lavado*

- Se centrifuga y pone en tampón Millonig durante 20 minutos. Se repite la operación tres veces con intervalo de 15 minutos. Se tiene en tampón toda la noche a 4°C.

Postfijación en osmio. Se centrifugan en Sorvall, añadiendo 1 cc de osmio al 2%. Se mantiene una hora en nevera y otra más a temperatura ambiente. Esta es la fijación que complementa de modo imprescindible al endurecimiento y pre fijación que realiza el glutaraldehído.

NOTA.- El osmio se prepara con dos cápsulas de osmio de 1/2 g en un frasco con 50 cc de Millonig, manteniéndolo 48 horas en nevera.

- Inclusión en agar. Se centrifuga en Sorvall 10 minutos a 10.000 r.p.m. Se lava con tampón, se centrifuga y saca con pipeta el agua sobrante, tras colocar las Chlamydomonas en

vidrio de reloj y (siguiendo a HALER) para que no se difundan las Chlamydomonas, se incluyen en agar común al 2%, fundido previamente al baño María, añadiéndolo sobre el vidrio de reloj y mezclándolo bien con las Chlamydomonas. Una vez frío se cortan en pequeños trozos eligiendo los que contengan mayor número de Chlamydomonas. Una vez fijados se deshidratan en acetonas por los siguientes pasos:

3) Deshidratación

- Se lava en agua destilada.
- Acetona al 30% 15 min
- Acetona al 50% 30 min
- Acetona al 70% 30 min
- Acetona al 70% con contraste . 36 horas

NOTA.- El contraste se prepara con acetato de uranilo del 2% y en Acetona del 70%.

- Acetona al 90% 30 min
- Acetona al 100% 30 min
- Acetona al 100% + SO_4Cu hasta saturación. 30 min
- Acetona al 100% + SO_4Cu hasta saturación. 30 min

NOTA.- Las cápsulas hay que ponerlas en estufa a 37°C.

4) Inclusión en Araldita o Durapón

- Oxido de propileno 1 h
- Oxido de propileno 1 h
- Oxido de propileno + Araldita I (3:1) 2 h
- Oxido de propileno + Araldita I (2:2) 2 h
- Oxido de propileno + Araldita I (1:3) 12 h o 24 h
- Araldita I a 50°C 2 h o más
- Araldita I Toda la noche o (3 días o más)
- Araldita II a 50°C 1 h
- Araldita II a 50°C 30 min

5) Endurecimiento de la inclusión

- Las cápsulas de gelatina se pondrán a secar en estufa a 37°C durante 2 días y 1 hora antes de su empleo se pondrán en estufa a 60°C.
- Las muestras retiradas del último paso se colocan en las cápsulas de gelatina secas, que se llenarán con la mezcla de Araldita II (tomándolo del recipiente en que se ha preparado) y después de cerrar las cápsulas, secas, se dejan en estufa a 50°-80°C durante 48 horas como mínimo, para su endurecimiento.

Los bloques que así se obtienen son de color amarillo oro, con una dureza idéntica a la del metacrilato.

Precauciones en el empleo del Durapón

- 1°) Debe evitarse respirar los vapores.
- 2°) Su contacto con la piel puede producir irritaciones alérgicas.
- 3°) En caso de salpicaduras debe lavarse inmediatamente la parte afectada con ácido bórico al 3%.

Araldita I

<u>Componente</u>	<u>Color distintivo</u>	<u>Producto</u>	<u>Proporción</u>
B	Azul	Endurecedor	10,00 ml
D	Verde	Plastificante	0,15 ml
A/M	Rojo	Resina epoxi	10,00 ml

Araldita II

<u>Componente</u>	<u>Color distintivo</u>	<u>Producto</u>	<u>Proporción</u>
B	Azul	Endurecedor	10,00 ml
C	Amarillo	Acelerador	0,40 ml
D	Verde	Plastificante	0,15 ml
A/M	Rojo	Resina epoxi	10,00 ml

NOTA.- Se recomienda preparar las mezclas I y II al menos 20 ó 30 minutos antes de su empleo, y agitar fuerte-

mente el matraz cada vez que se incorpora un componente. Con objeto de obtener una homogeneidad adecuada, es preciso que durante este tiempo se conserven las mezclas en estufa a 50°. Sin embargo, la mezcla II no se puede preparar con más anticipación porque podría polimerizarse.

El material de vidrio debe ser sumergido en acetona benzol o alcohol etílico absoluto y luego lavado. Se emplea absolutamente seco.

6) Secciones

Los bloques de tejido incluidos en Araldita se cortan en ultramicrotomo Reichert, montándolos en rejillas de cobre que tenían sobre ellas dispuestas finas membranas de Formvar, para mantener los cortes.

7) Contrastado

Los cortes se tratan con solución de acetato de plomo, siguiendo la técnica Reynold, para contrastar las estructuras.

Para evitar que penetre polvo en las manipulaciones, se mantienen los cortes en placas Petri tapadas.

8) Observaciones

Los cortes se han observado y fotografiado con un microscopio Zeiss E.M. 9, con iluminación automática. Para las fotografías se empleó película plana Gevaert.

III.6. METODO PARA DETECTAR EL EFECTO DE HERBICIDAS Y DETERGENTES SOBRE LA FASE LUMINICA DE LA FOTOSINTESIS, SOBRE CHLAMYDOMONAS OBLONGA

- Se centrifuga el medio con Chlamydomonas, durante 20 minutos a 6500 r.p.m.
- Se lavan con tampón fosfatos de pH 6,9, dos veces, centrifugando cada vez 20 minutos a 6500 r.p.m.

- Se decanta y añaden 10 ml de tampón fosfatos.
- Se preparan dos series de tubos para Spectronic por parejas.

En la primera se coloca como control: 5 ml de tampón fosfatos de pH 6,9 y 1 ml de Chlamydomonas resuspendidos en 10 ml de tampón.

En la segunda serie, enfrentándolos con las parejas control correspondientes: 4 ml de tampón, 1 ml de Chlamydomonas y 1 ml de 2,6-diclorofenol indofenol "D.P.I.P" al 5%.

- Seguidamente se mide la densidad óptica de cada tratamiento, ajustando el cero con el tubo control y anotando la D.O. que marca el correspondiente de la segunda serie.
- Se iluminan con lámpara de 100 wátios, colocando la gradilla a 20 cm de distancia. A los 5 minutos se mide nuevamente la D.O. y se somete de nuevo a iluminación.

Se repiten estos procesos cada 5 minutos hasta un total de 25 minutos.

Los resultados se representan en gráficas tiempo-D.O.

IV. ESQUEMA DEL TRABAJO PROPUESTO

IV.1. ESQUEMA DEL TRABAJO PROPUESTO

Para proporcionar un guión de conjunto de los propósitos del presente trabajo, damos, seguidamente, un esquema de las pruebas realizadas con Chlamydomonas oblonga y que serán analizadas en la exposición de resultados.

a) Experimentos preliminares.- Se estudian las condiciones más favorables para los cultivos con Chlamydomonas en medio control (iluminación, temperatura, pH) con el fin de lograr reducir la fase de latencia inicial, alcanzando en breve tiempo su fase logarítmica.

b) Influencia de las distintas concentraciones de Herbicidas y Detergentes sobre el crecimiento de Chlamydomonas, descartando las que resultan letales y eligiendo de entre las biostáticas aquellas que en tiempo mínimo producen cambios morfológicos (ópticamente) y en la pigmentación, que servirán de base para experimentaciones sucesivas.

c) Estudio de los pigmentos: 1° en medio control a pH 6,5 e iluminación constante, durante 48 horas. 2° Cambios en los pigmentos de Chlamydomonas cultivadas en las condiciones de los controles, añadiendo los distintos Herbicidas y Detergentes a la concentración seleccionada de 0,01% del producto comercial.

d) 1° Estudio de la ultraestructura de Chlamydomonas oblonga en medio control, fijadas con OsO_4 e incluidas en Araldita. 2° Cambios provocados en la ultraestructura de Chlamy-

domonas por los distintos Herbicidas, a concentración de 100 p.p.m., manteniéndolos en condiciones idénticas a los controles durante 48 horas.

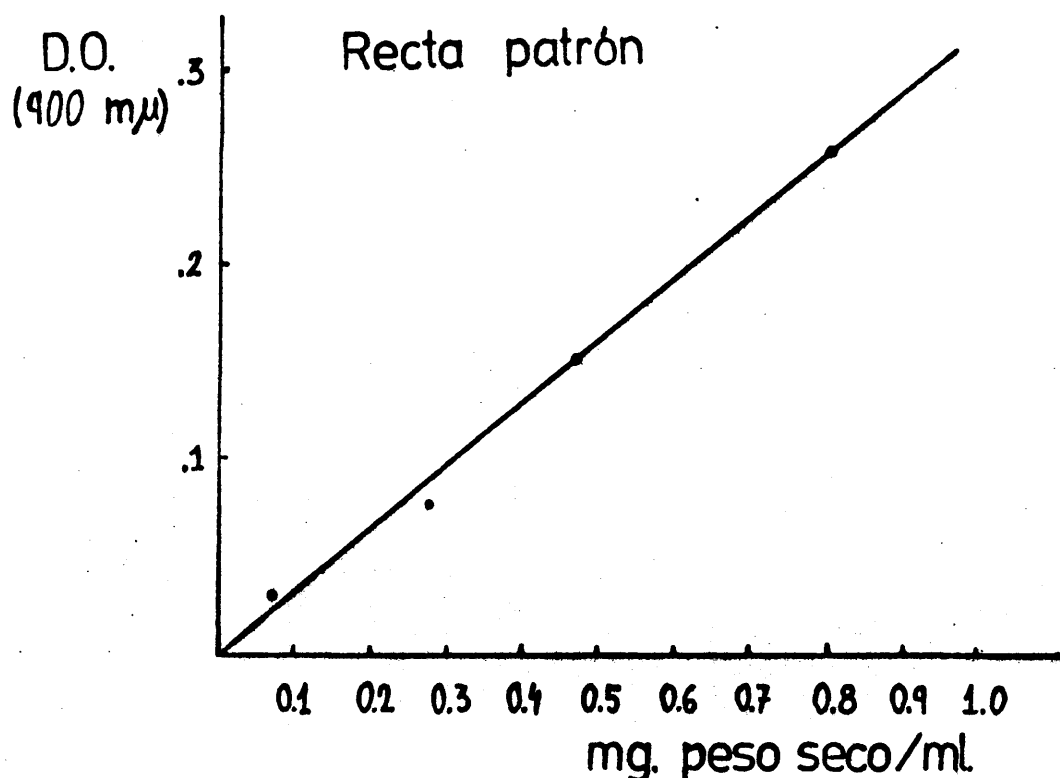
e) Comprobación funcional de las modificaciones ultraestructurales encontradas en microscopía electrónica, basándonos en la propiedad que tiene el DPIP, para restablecer la cadena de electrones en el Fotosistema II, si los Herbicidas y Detergentes no interfieren en la fotólisis del agua.

V. PARTE EXPERIMENTAL.

V.1. ESTUDIOS PRELIMINARES

Se cultiva la estirpe elegida en el medio "4" (Proteosa-Peptona), manteniendo los cultivos a 28°C e iluminación constante.

A los 11 días se toma el cultivo, para estudiar en el control la absorción frente a peso seco, midiendo a 900 m μ .



Recta patrón de Chlamydomonas oblonga que expresa el peso seco en mg, frente a su correspondiente densidad óptica.

Los cultivos se hicieron en medio líquido según el protocolo marcado en el capítulo III.2.

La D.O. se midió a 900 m μ .

V.2. INFLUENCIA DE LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES DE HERBICIDAS Y DETERGENTES SOBRE EL CRECIMIENTO DE CHLAMYDOMONAS OBLONGA

- Se prepararon tubos especiales para Spectronic 20, conteniendo medio de cultivo "4" y las concentraciones a estudiar, ajustando el pH a 6,5, manteniéndolos durante 11 días a 28°C e iluminación constante, siguiendo los siguientes protocolos:
- Se inoculó 1 ml de Chlamydomonas cultivada en medio normal en tubos especiales para Spectronic, conteniendo 9 ml del medio, se inocularon 3 tubos por concentración de antibiólógicos a estudiar y en un 4º tubo de la concentración no se sembraron Chlamydomonas, para que sirviera de control, eliminando así la absorbancia propia del medio.
- Las medidas en el Spectronic se efectuaron en el momento de la siembra y cada 24 horas. Hasta un total de 11 días. La longitud de onda seleccionada fue de 900 mμ, con el fin de eliminar la turbidez que proporcionan los pigmentos.

Se hizo la media aritmética de los D.O. de los 3 tipos de cada concentración, representándolos en los diagramas absorbancia-días, expresadas en las tablas y gráficas I a XIII.

De su estudio se deduce que las sales de Dipiridilo (como el Diquat y Paraquat), provocan una disminución sensible del crecimiento a la dosis de 10 a 100 ppm, resultando letales a partir de 1000 ppm.

Los compuestos orgánicos no nitrogenados, como el Trioxone = 2,4,5-triclorofenoxiacético, estimulan su crecimiento comportándose como una auxina vegetal pero tienen un efecto posterior letal a dosis de 100 a 1000 ppm. LEOPOLD. (1965) lo atribuye al agotamiento respiratorio de las células, formación de materiales tóxicos y activación del metabolismo del fósforo.

La acción de los compuestos nitrogenados derivados de la urea, decrece considerablemente desde 100 ppm y lo inhi

be a 1000 ppm. Así sucede con el Diurón (Karmex) y Linurón (Lorox).

Los compuestos orgánicos derivados de las Triazinas, como Simazina y Atrazina, disminuyen el crecimiento quizá por influir sobre los procesos de división.

Los detergentes por su gran poder tensoactivo, actúan como inhibidores del crecimiento ya a dosis de 100 ppm respecto al control.

TABLA I

Influencia de la concentración del Detergente FENOPON
en el crecimiento de Chlamydomonas oblonga

ppm días	Control	10	100	1000
0 horas	.005	.005	.005	.005
1	.010	.010	.010	.005
	.010	.010	.010	.005
	.010	.010	.010	.005
2	.010	.010	.010	.005
	.010	.010	.010	.005
	.010	.010	.010	.005
3	.010	.015	.010	.005
	.010	.015	.010	.005
	.010	.010	.010	.005
4	.015	.015	.010	.005
	.015	.015	.010	.005
	.015	.010	.010	.005
5	.015	.010	.010	.005
	.015	.010	.010	.005
	.015	.010	.010	.005
6	.025	.015	.010	.005
	.025	.015	.020	.005
	.025	.015	.010	.005
7	.035	.015	.010	.005
	.030	.020	.020	.005
	.025	.025	.010	.005
9	.035	.020	.010	.005
	.070	.020	.020	.005
	.030	.025	.010	.005
11	.045	.025	.010	.005
	.010	.030	.020	.005
	.040	.025	.020	.005

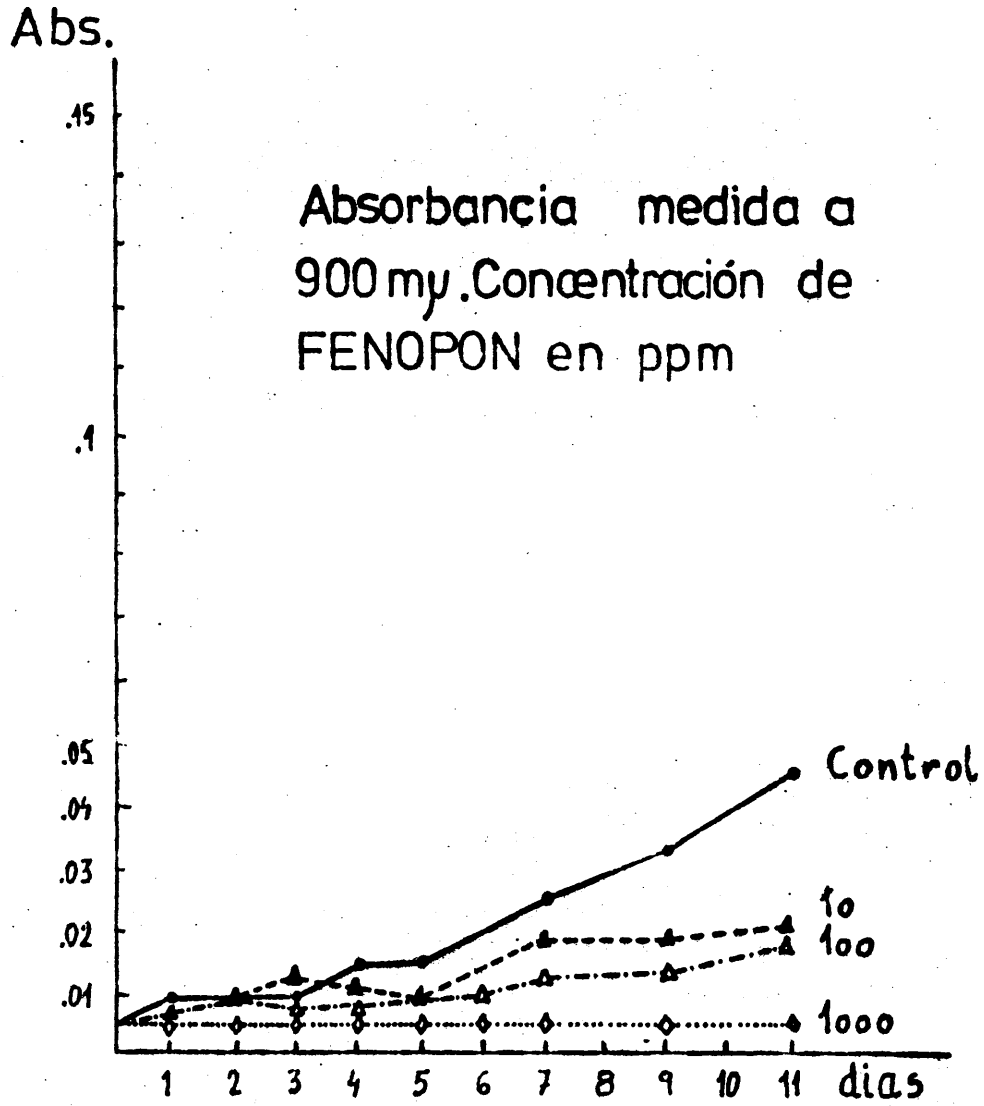


Fig. 1.- Influencia de la concentración de Fenopón sobre el crecimiento de Chlamydomonas oblonga, a 28°C e iluminación constante.

TABLA II

Influencia de la concentración del Detergente LISSAPOL sobre el crecimiento de Chlamydomonas oblonga

ppm días	Control	10	100	1000
0 horas	.005	.005	.005	.005
1	.010	.010	.010	.005
	.010	.005	.010	.005
	.010	.005	.010	.005
2	.010	.010	.010	.005
	.010	.010	.010	.005
	.010	.010	.010	.005
3	.010	.010	.010	.005
	.010	.010	.010	.005
	.010	.010	.020	.005
4	.015	.010	.010	.005
	.015	.015	.010	.005
	.015	.015	.020	.005
5	.015	.015	.010	.005
	.015	.015	.010	.005
	.015	.015	.010	.005
7	.025	.020	.025	.005
	.025	.025	.020	.005
	.025	.025	.010	.005
9	.040	.025	.030	.005
	.030	.030	.030	.005
	.025	.030	.010	.005
11	.035	.035	.030	.005
	.070	.030	.030	.005
	.030	.030	.010	.005

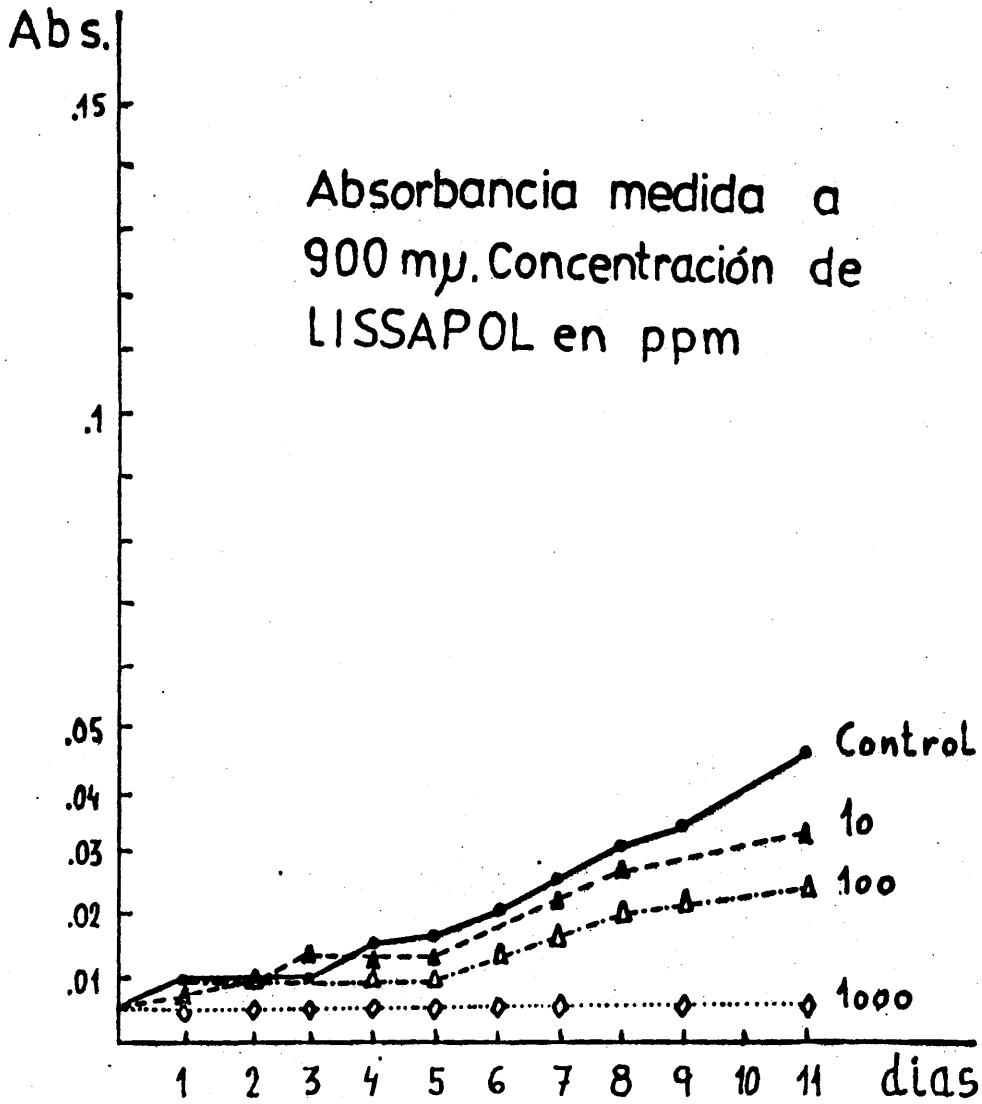


Fig. 2.- Influencia de la concentración de Lissapol sobre el crecimiento de Chlamydomonas oblonga, a 28°C e iluminación constante.

TABLA III

Influencia de la concentración del Detergente DOBANE
en el crecimiento de Chlamydomonas oblonga

ppm días	Control	10	100	1000
0 horas	.005	.005	.005	.005
1	.012	.012	.005	.005
	.010	.010	.005	.005
2	.020	.010	.005	.005
	.015	.005	.005	.005
3	.010	.005	.005	.005
	.010	.010	.005	.005
4	.020	.010	.011	.005
	.015	.015	.010	.005
5	.015	.015	.005	.005
	.020	.015	.010	.005
7	.015	.015	.005	.005
	.015	.015	.010	.005
9	.020	.020	.005	.005
	.015	.020	.005	.005
11	.020	.025	.010	.005
	.025	.030	.005	.005
	.025	.045	.010	.005
	.070	.035	.010	.005
	.100	.080	.010	.010
	.095	.090	.010	.010
	.070	.055	.015	.010
	.140	.130	.020	.010
	.120	.120	.020	.010
	.125	.080	.020	.010

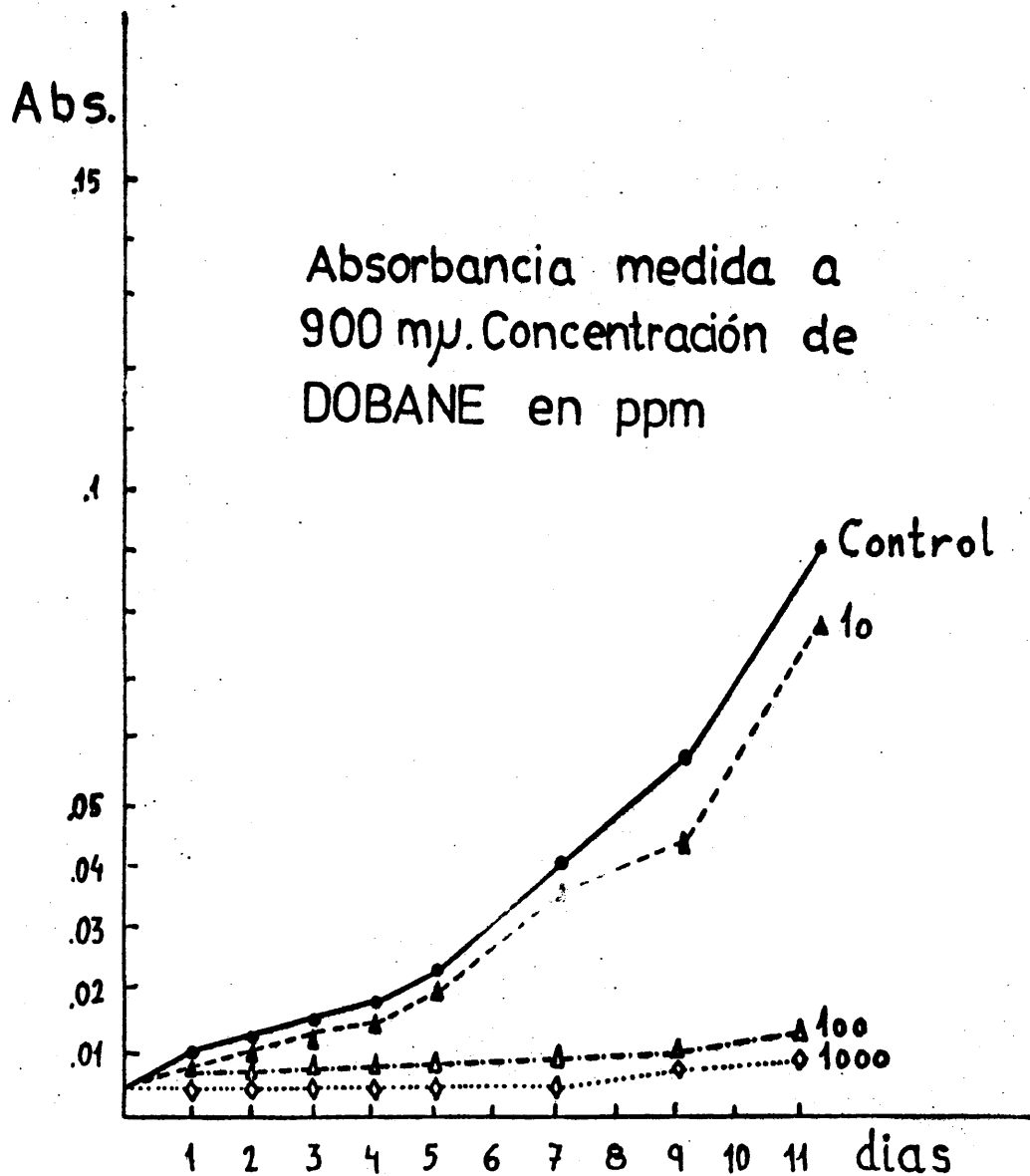


Fig. 3.- Influencia de la concentración de Dobane sobre el crecimiento de Chlamydomonas oblonga, a 28°C e iluminación constante.

TABLA IV

Influencia de la concentración del Detergente DS 4499
en el crecimiento de Chlamydomonas oblonga

ppm días	Control	10	100	1000
0 horas	.005	.005	.005	.005
1	.012	.005	.005	.005
	.015	.005	.005	.005
2	.010	.005	.005	.005
	.015	.010	.001	.005
	.010	.005	.005	.005
3	.010	.010	.005	.005
	.020	.015	.010	.005
	.015	.010	.005	.005
4	.015	.015	.015	.010
	.020	.020	.010	.005
	.020	.010	.010	.001
5	.015	.015	.015	.015
	.025	.025	.015	.010
	.020	.015	.015	.010
7	.030	.020	.020	.015
	.030	.055	.045	.040
	.025	.025	.025	.005
9	.075	.035	.025	.005
	.055	.065	.050	.040
	.080	.040	.030	.010
11	.040	.050	.030	.005
	.070	.080	.075	.045
	.010	.055	.050	.005
	.095	.070	.055	.010

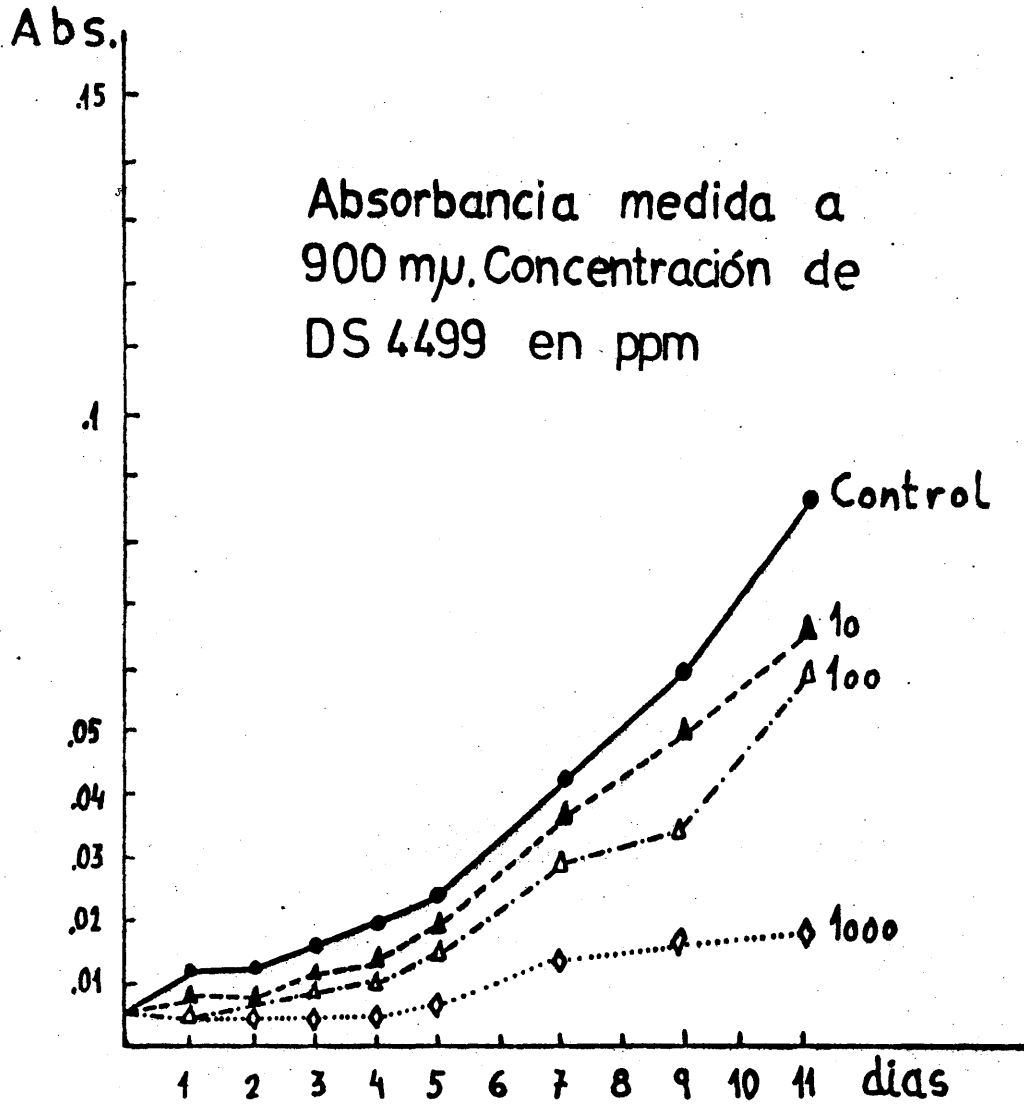


Fig. 4.- Influencia de la concentración de DS 4499, sobre el crecimiento de Chlamydomonas oblonga, a 28°C e iluminación constante.

TABLA V

Influencia de la concentración del Detergente DSD en el crecimiento de Chlamydomonas oblonga

ppm días	Control	10	100	1000
0 horas	.005	.005	.005	.005
1	.010	.010	.010	.005
	.010	.005	.010	.005
	.010	.005	.010	.005
2	.010	.010	.010	.005
	.010	.010	.010	.005
	.010	.010	.010	.005
3	.010	.010	.010	.005
	.010	.010	.010	.005
	.010	.010	.020	.005
4	.015	.010	.010	.005
	.015	.015	.010	.005
	.015	.015	.020	.005
5	.015	.015	.010	.005
	.015	.015	.010	.005
	.015	.015	.010	.005
7	.025	.020	.025	.005
	.025	.025	.020	.005
	.025	.025	.010	.005
9	.040	.025	.030	.005
	.030	.030	.030	.005
	.025	.030	.010	.005
11	.035	.035	.030	.005
	.070	.030	.030	.005
	.030	.030	.010	.005

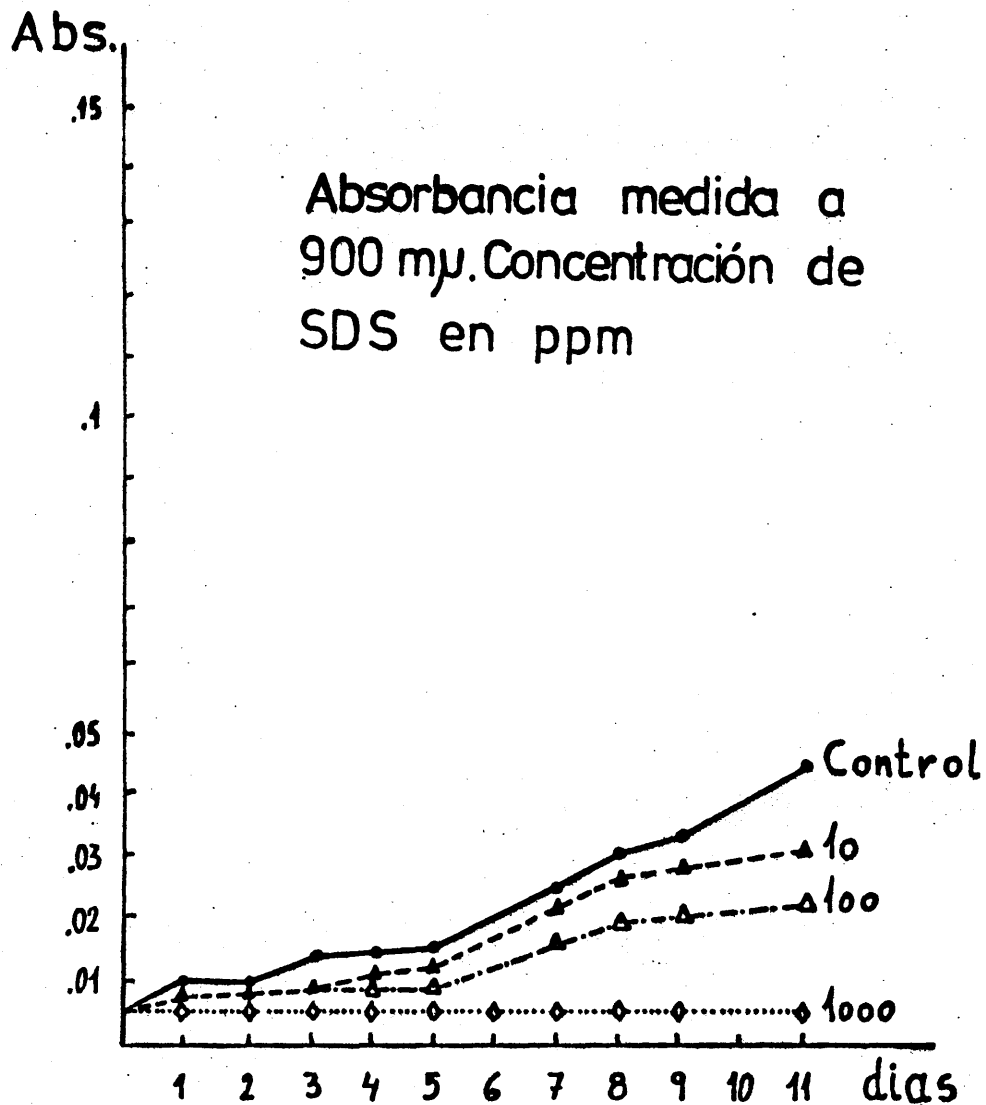


Fig. 5.- Influencia de la concentración de SDS sobre el crecimiento de Chlamydomonas oblonga, a 28°C e iluminación constante.

TABLA VI

Influencia de la concentración del Herbicida REGLONE,
en el crecimiento de Chlamydomonas oblonga

ppm días	Control	10	100	1000
0 horas	.005	.005	.005	.005
1	.016	.010	.010	.005
	.014	.010	.010	.005
	.015	.010	.010	.005
2	.050	.030	.030	.009
	.030	.040	.010	.010
	.040	.020	.020	.011
3	.050	.040	.030	.020
	.040	.040	.030	.020
	.030	.040	.030	.020
4	.045	.040	.030	.040
	.055	.050	.030	.020
	.050	.060	.050	.030
5	.060	.050	.050	.040
	.060	.050	.040	.040
	.060	.050	.060	.040
7	.090	.070	.050	.060
	.085	.080	.050	.030
	.095	.090	.050	.030
9	.090	.090	.070	.040
	.130	.100	.070	.040
	.140	.110	.070	.040
11	.090	.100	.060	.020
	.130	.100	.040	.020
	.140	.100	.050	.020

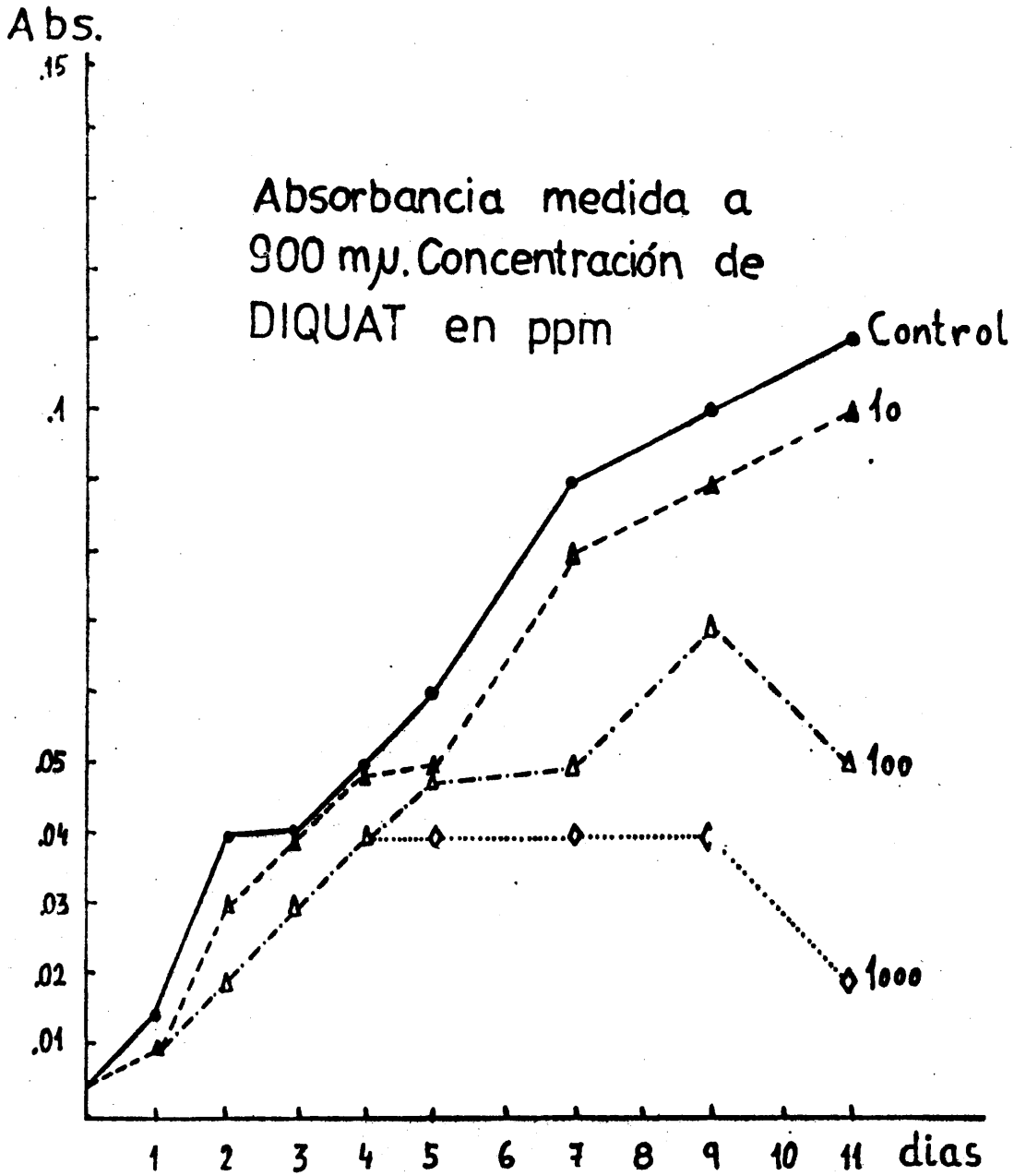


Fig. 6.- Influencia de la concentración de Diquat sobre el crecimiento de Chlamydomonas oblonga, a 28°C e iluminación constante.

TABLA VII

Influencia de la concentración del Herbicida GRAMOXONE
en el crecimiento de Chlamydomonas oblonga

ppm días	Control	10	100	1000
0 horas	.005	.005	.005	.005
1	.010	.010	.010	.010
	.010	.005	.010	.010
	.010	.005	.010	.010
2	.010	.010	.010	.010
	.010	.010	.010	.010
	.010	.010	.010	.010
3	.010	.010	.015	.010
	.010	.010	.015	.010
	.010	.010	.015	.010
4	.015	.010	.015	.010
	.015	.015	.015	.010
	.015	.015	.010	.010
5	0.15	.015	.010	.010
	0.15	.015	.010	.010
	.015	.015	.010	.010
7	.025	.020	.015	.010
	.025	.025	.015	.020
	.025	.025	.015	.010
9	.040	.025	.015	.010
	.030	.030	.020	.025
	.025	.030	.025	.010
11	.035	.035	.020	.010
	.070	.030	.020	.020
	.030	.030	.025	.020

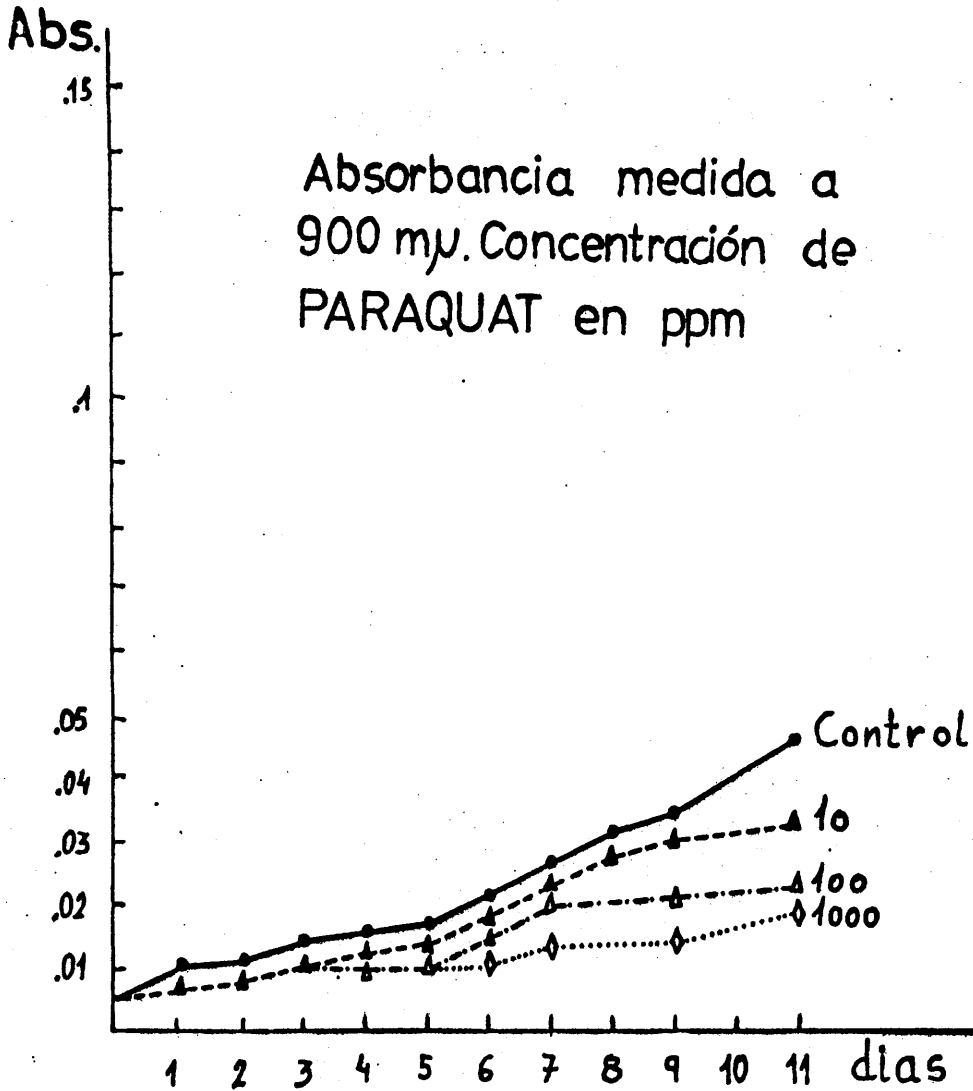


Fig. 7.- Influencia de la concentración de Paraquat sobre el crecimiento de Chlamydomonas oblonga, a 28°C e iluminación constante.

TABLA VIII

Influencia de la concentración del Herbicida TRIOXONE
en el crecimiento de Chlamydomonas oblonga

ppm días	Control	10	100	1000
0 horas	.005	.005	.005	.005
1	.012	.010	.015	.005
	.010	.010	.010	.005
	.020	.010	.010	.005
2	.015	.005	.010	.005
	.010	.005	.005	.005
	.010	.005	.005	.005
3	.020	.010	.010	.005
	.015	.010	.010	.005
	.015	.010	.015	.005
4	.020	.010	.010	.005
	.015	.010	.010	.005
	.015	.010	.015	.005
5	.020	.015	.015	.005
	.015	.015	.010	.005
	.020	.015	.010	.005
7	.025	.030	.015	.005
	.027	.030	.010	.005
	.070	.030	.010	.005
9	.055	.035	.025	.010
	.080	.020	.020	.010
	.035	.040	.020	.005
11	.100	.055	.025	.010
	.095	.045	.030	.010
	.070	.050	.035	.010

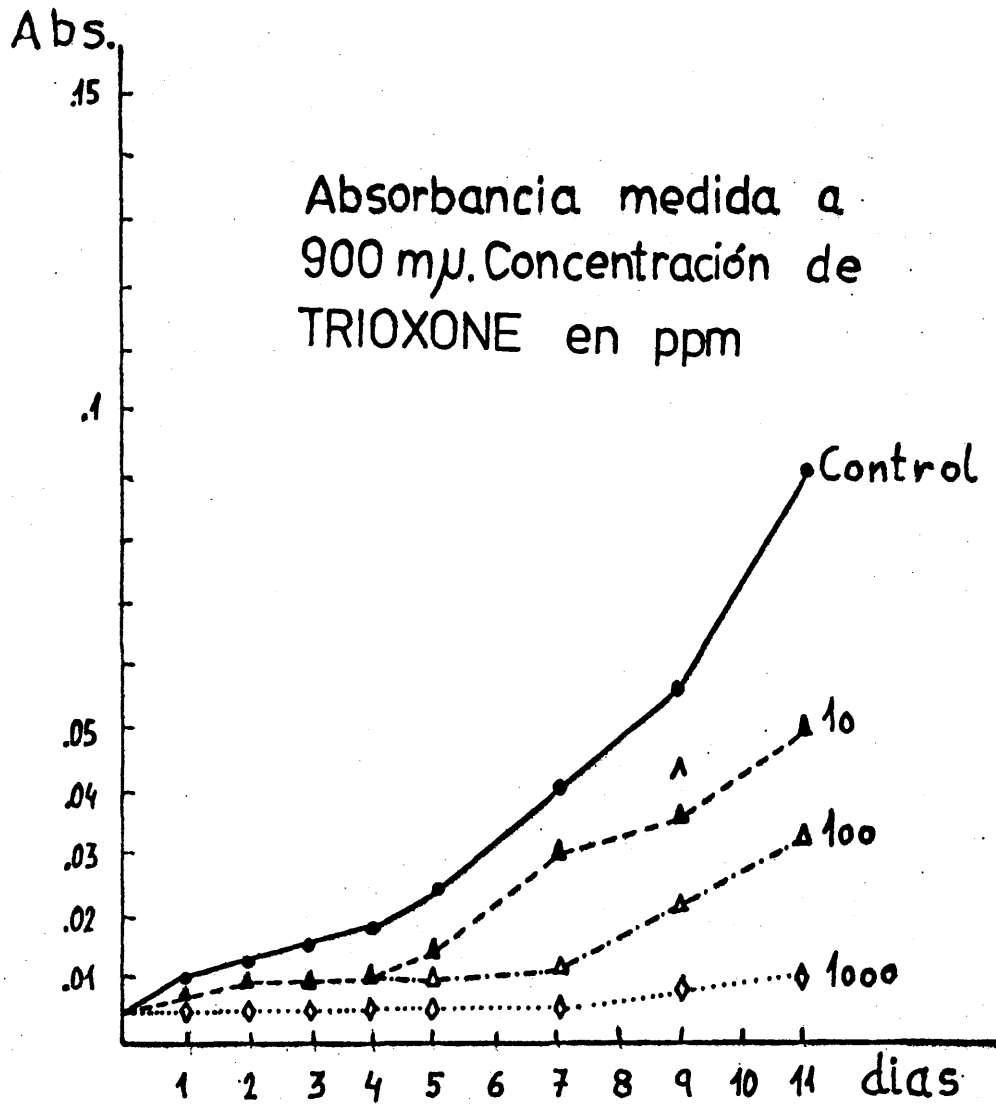


Fig. 8.- Influencia de la concentración de Trioxone sobre el crecimiento de Chlamydomonas oblonga, a 28°C e iluminación constante.

TABLA IX

Influencia de la concentración del Herbicida HYVARX
en el crecimiento de Chlamydomonas oblonga

ppm días	Control	10	100	1000
0 horas	.005	.005	.005	.005
1	.012	.010	.010	.005
	.015	.010	.010	.005
2	.010	.005	.005	.005
	.015	.005	.015	.005
3	.010	.010	.010	.005
	.010	.010	.005	.005
4	.020	.020	.025	.005
	.015	.020	.015	.005
5	.015	.020	.025	.010
	.020	.020	.025	.005
7	.020	.020	.020	.001
	.015	.015	.025	.015
9	.025	.025	.030	.010
	.020	.025	.025	.010
11	.030	.025	.025	.015
	.030	.040	.045	.040
11	.025	.055	.045	.005
	.075	.045	.040	.005
11	.055	.065	.070	.040
	.080	.070	.060	.010
11	.040	.065	.055	.005
	.070	.075	.060	.045
11	.010	.065	.065	.005
	.095	.081	.080	.010

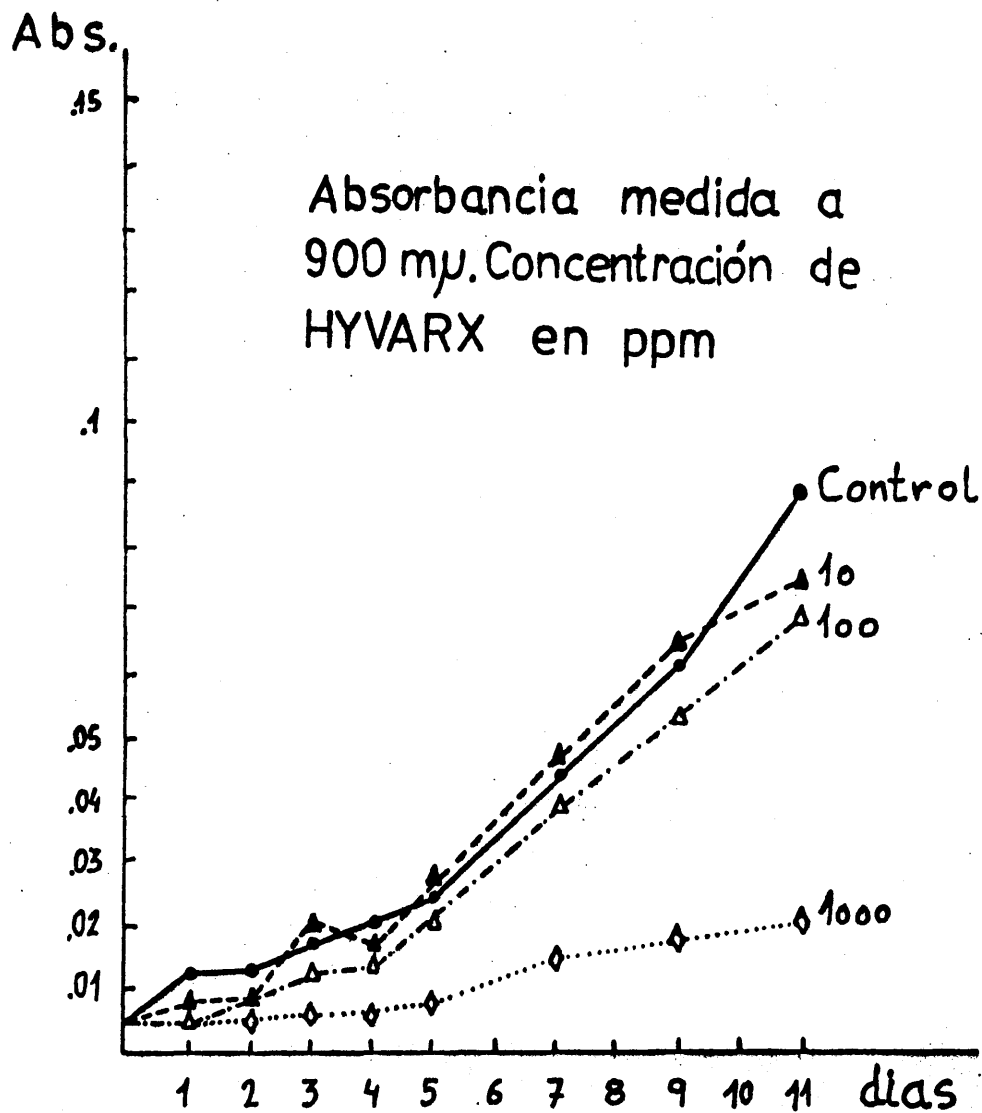


Fig. 9.- Influencia de la concentración de Hyvarx sobre el crecimiento de Chlamydomonas oblonga, a 28°C e iluminación constante.

TABLA X

Influencia de la concentración del Herbicida LOROX en el crecimiento de Chlamydomonas oblonga

ppm días	Control	10	100	1000
0 horas	.005	.005	.005	.005
1	.012	.010	.005	.005
	.015	.010	.005	.005
	.010	.005	.005	.005
2	.015	.015	.001	.005
	.010	.010	.001	.005
	.010	.005	.005	.005
3	.020	.025	.010	.005
	.015	.015	.005	.005
	.015	.025	.015	.010
4	.020	.025	.010	.005
	.020	.020	.010	.001
	.015	.025	.015	.015
5	.025	.030	.015	.010
	.020	.025	.015	.010
	.030	.025	.020	.015
7	.030	.045	.045	.040
	.025	.045	.025	.005
	.075	.040	.025	.005
9	.055	.070	.050	.040
	.080	.060	.030	.010
	.040	.055	.030	.005
11	.070	.060	.075	.045
	.010	.065	.050	.005
	.095	.080	.055	.010

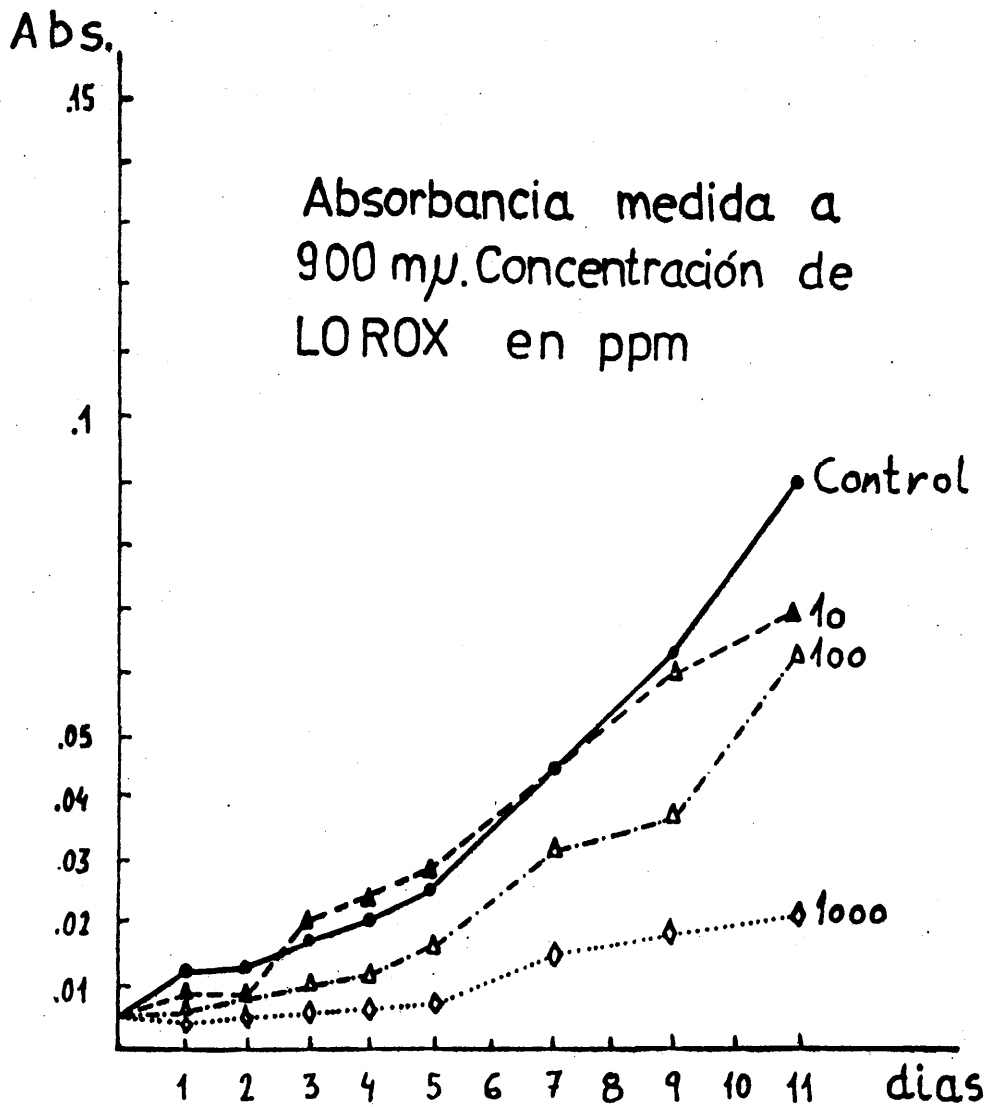


Fig. 10.- Influencia de la concentración de Lorox sobre el crecimiento de Chlamydomonas oblonga, a 28°C e iluminación constante.

TABLA XI

Influencia de la concentración del Herbicida KARMEX
en el crecimiento de Chlamydomonas oblonga

ppm días	Control	10	100	1000
0 horas	.005	.005	.005	.005
1	.012	.010	.010	.005
	.010	.010	.010	.005
	.020	.010	.010	.005
2	.015	.005	.005	.005
	.010	.005	.005	.005
	.010	.010	.005	.005
3	.020	.010	.010	.011
	.015	.015	.010	.010
	.015	.015	.010	.005
4	.020	.015	.010	.010
	.015	.015	.010	.005
	.015	.015	.010	.010
5	.020	.020	.015	.005
	.015	.020	.015	.005
	.020	.025	.015	.010
7	.025	.030	.030	.005
	.025	.045	.030	.010
	.070	.035	.030	.010
9	.055	.060	.030	.010
	.080	.035	.020	.010
	.035	.035	.040	.010
11	.100	.080	.055	.010
	.090	.090	.045	.010
	.070	.055	.050	.015

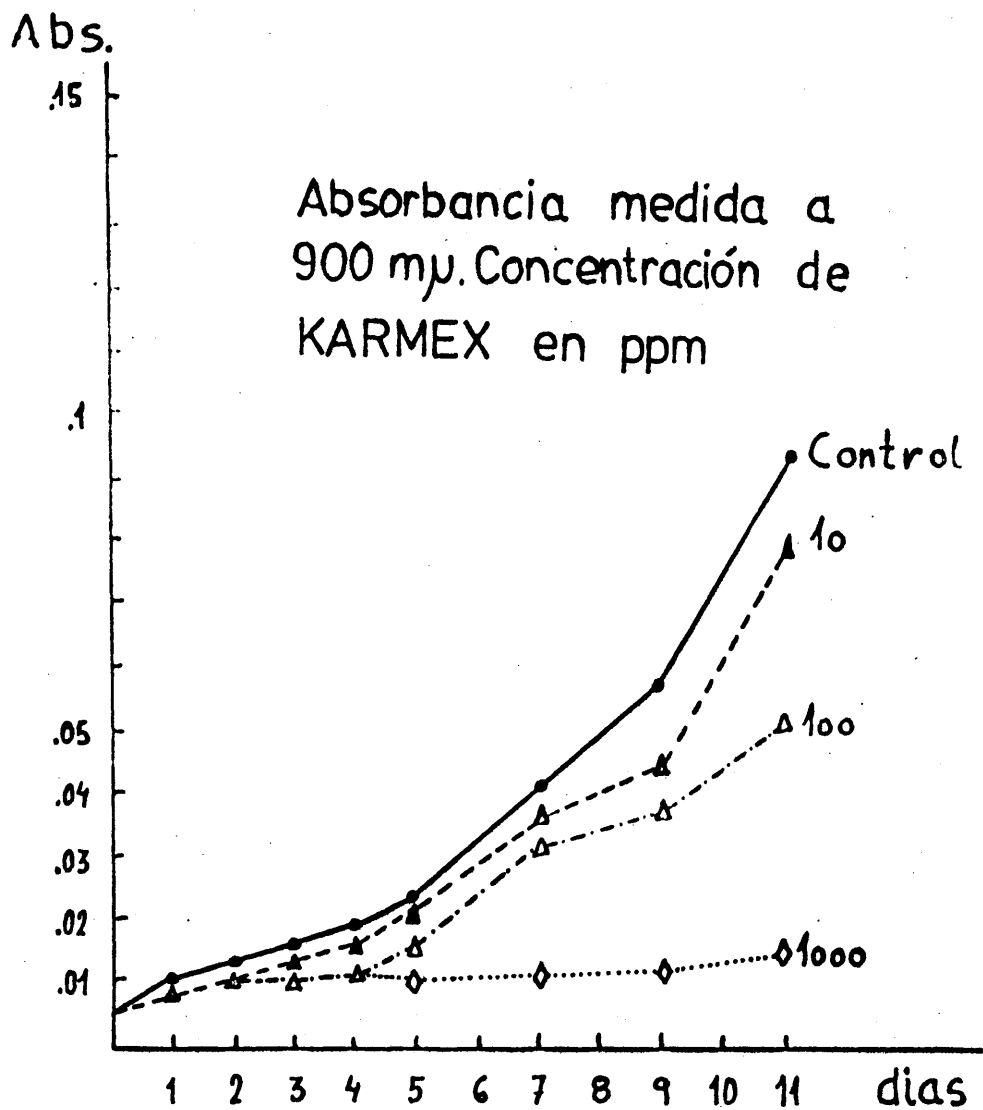


Fig. 11.- Influencia de la concentración de Karmex en el crecimiento de Chlamydomonas oblonga, a 28°C e iluminación constante.

TABLA XII

Influencia de la concentración del Herbicida SIMAZINA
en el crecimiento de Chlamydomonas oblonga

ppm días	Control	10	100	1000
0 horas	.005	.005	.005	.005
1	.005	.005	.005	.005
	.005	.005	.005	.005
	.005	.005	.005	.005
	.005	.005	.005	.005
2	.010	.010	.010	.010
	.010	.010	.010	.010
	.010	.010	.010	.010
	.010	.010	.010	.010
3	.020	.010	.010	.010
	.020	.015	.010	.010
	.020	.020	.010	.010
	.030	.015	.015	.015
4	.035	.015	.015	.010
	.035	.020	.015	.010
	.060	.030	.020	.015
	.060	.030	.015	.015
5	.070	.040	.020	.015
	.065	.045	.025	.015
	.070	.045	.020	.015
	.075	.040	.025	.025
6	.085	.055	.030	.020
	.095	.060	.025	.020
	.105	.050	.030	.030
	.105	.050	.030	.030

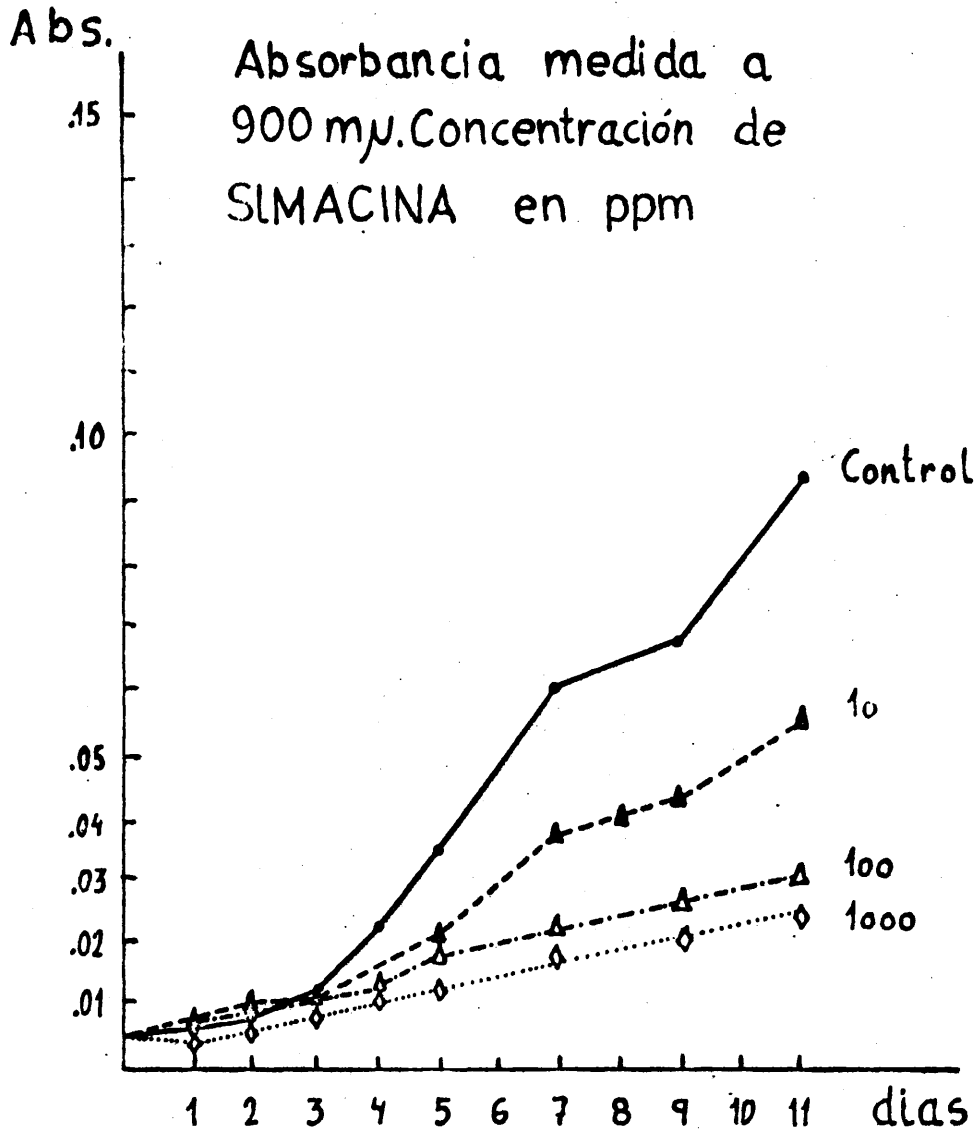


Fig. 12.- Influencia de la concentración de Simazina sobre el crecimiento de Chlamydomonas oblonga, a 28°C e iluminación constante.

TABLA XIII

Influencia de la concentración del Herbicida ATRAZINA
en el crecimiento de Chlamydomonas oblonga

ppm días	Control	10	100	100
0 horas	.005	.005	.005	.005
1	.015	.010	.010	.015
	.015	.010	.020	.015
	.010	.015	.020	.015
2	.010	.015	.010	.015
	.010	.015	.020	.015
	.010	.015	.020	.015
3	.020	.010	.020	.015
	.015	.015	.025	.015
	.015	.015	.025	.015
4	.030	.025	.030	.020
	.040	.020	.030	.015
	.030	.015	.025	.015
5	.040	.035	.030	.030
	.040	.035	.030	.035
	.050	.025	.025	.025
7	.080	.070	.050	.045
	.085	.070	.045	.035
	.085	.055	.035	.030
9	.011	.090	.065	.060
	.011	.095	.065	.040
	.010	.065	.060	.040
11	.125	.090	.075	.070
	.125	.110	.045	.050
	.120	.080	.070	.050

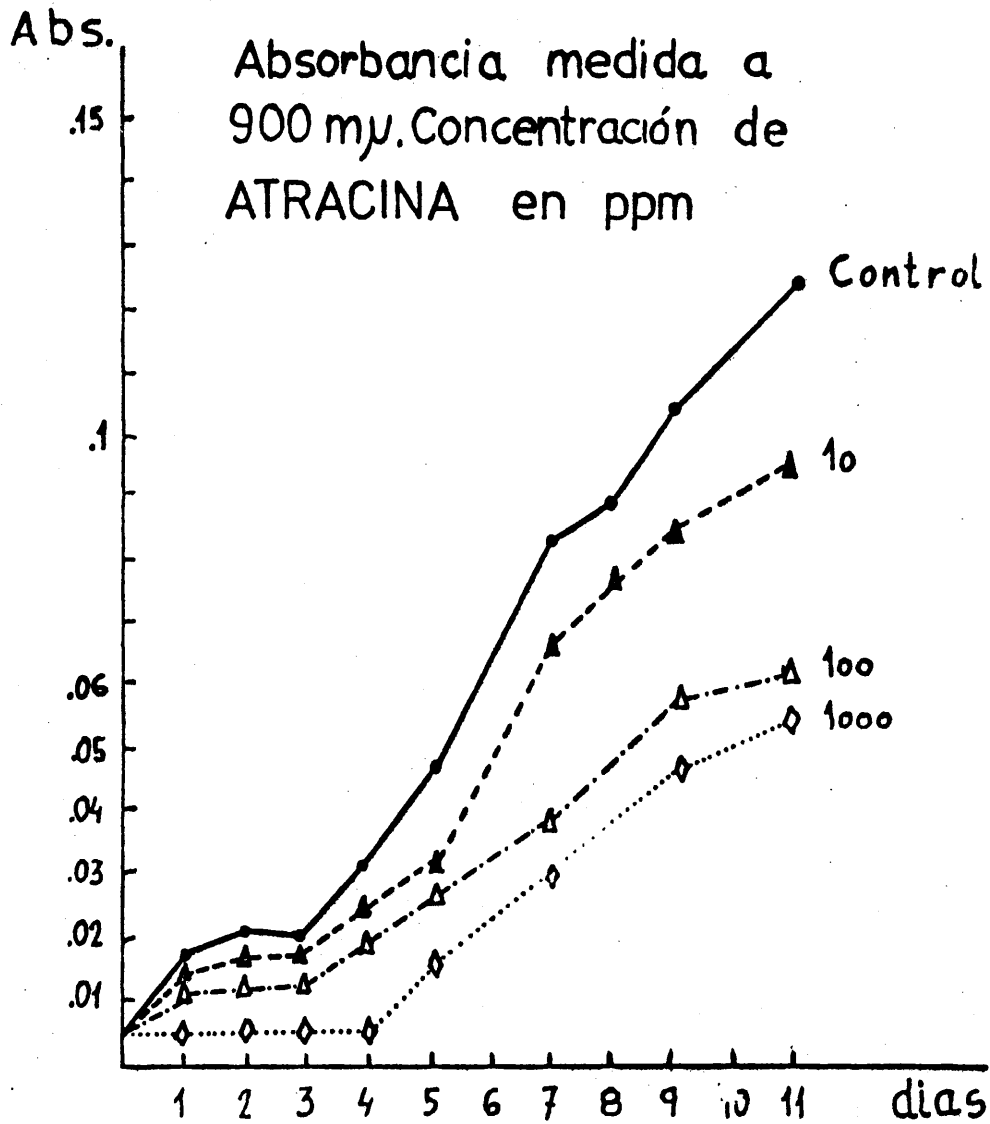


Fig. 13.- Influencia de la concentración de Atrazina sobre Chlamydomonas oblonga, a 28°C e iluminación constante.

V.3. ESTUDIO DE PIGMENTOS

Se estudian los pigmentos posibles del control, como punto de referencia para el comportamiento de los mismos en Chlamydomonas después tratadas con herbicidas y detergentes a la dosis de 100 ppm, elegida por no resultar letal a las 48 horas.

a) Para los controles y siguiendo a EGON STAHL (1967) se calcula por cromatografía en capa fina los posibles Rf de las manchas de los pigmentos.

Tomando cultivos de Chlamydomonas en medio proteosa-peptona, que han crecido a temperatura ambiente, pH 6,5 e iluminación constante, se lavan dos veces con tampón fosfatos de pH 6,9 y centrifugándolos a 6500 r.p.m. durante 20 minutos, se eluyen en acetona al 85% toda la noche.

Usando placas de Silicagel Guach Stall como fase fija; éter-petróleo y propanol (99:1) como solvente y frente de 16 cm y manteniendo en cubetas cerradas y en oscuridad, al cabo de 40 minutos los frentes alcanzados por los distintos pigmentos son:

Frentes móviles:

- 15 cm; $Rf = 15/15 \cdot 100 = 100$
- 7,1 cm; $Rf = 7,1/15 \cdot 100 = 47,3$
- 7 cm; $Rf = 7/15 \cdot 100 = 46,6$
- 5,8 cm; $Rf = 5,8/15 \cdot 100 = 38,6$

Por tanto, según referencia tomada de BUNT (J.S. Nature, 203, 1261; 1964) y nuestros propios datos, calculando por aproximación tendremos:

- $Rf = 38,6$ corresponde a 65, posible "VIOLAXANTINA"
- $Rf = 46,6$ corresponde a 92, "CLOROFILA a"
- $Rf = 47,6$ corresponde a 96, "CLOROFILA b"
- $Rf = 100$ corresponde a 100, "β, CAROTENO"

b) Para reafirmar la presencia de estos pigmentos, también por cromatografía en capa fina, siguiendo a MARGARET HOLDEN (1962):

Actuamos como en el caso anterior, eluyendo en acetona,

Chlamydomonas cultivadas en medio normal y en las condiciones y tiempo ya fijadas.

- Se toma como frente fijo 15 cm.
- Fase fija Kieselgel (10 mg, en 20 ml de agua).
- Solvente: Eter-petróleo, Isopropanol y agua destilada (100 cc, 10 y 0,25 cc).

Se meten las placas con los pigmentos colocados en el frente inicial y se introducen en cubetas conteniendo el solvente, en la oscuridad.

A los 60 minutos aproximadamente, alcanza el frente. Se sacaron las placas y rasparon por separado las manchas, echándolas con tampón fosfatos en tubo de espectro.

El frente alcanzado por ellas fue: 15; 5,4; 5,4 y 4,7 cm.

Se recorrió la escala con cada uno de ellos, entre 335 y 700 m μ .

Los resultados se expresan en las gráficas 14, 15, 16 y 17, cuyos máximos parecen corresponder a los pigmentos encontrados por el primer procedimiento. Es decir, clorofilas a y b; β -caroteno y como dudosa Violaxantina.

c) Medida de los pigmentos por espectrofotometría. Se estudió el conjunto de pigmentos de Chlamydomonas en medio control, actuando como sigue:

- Centrifugamos en C. Wifug a 6500 r.p.m. durante 20 minutos. Se lavaron dos veces con tampón fosfatos (pH 6,9) y tras decantar, se eluyó en acetona al 85% durante la noche, en nevera.

A la mañana siguiente se midió el espectro evitando en todo momento la oxidación de pigmentos, tapando las gradillas con papel de estaño.

Los resultados se expresan en la gráfica n° 18 que representa longitudes de onda-D.O.

- Tomando esta gráfica como referencia, se procedió a estudiar los cambios sufridos en los pigmentos, por la acción

de los herbicidas y detergentes, usados como producto comercial, a la concentración de 0,01%.

Los resultados se expresan en las gráficas 14 a 24 inclusive.

Los detergentes producen una rápida destrucción de las clorofilas y carotenoides como dedujeron GOEDHEER (1958) y NEWTON (1963) en sus estudios sobre el efecto del SDS sobre cromatóforos.

Los herbicidas del grupo de las sales de bupiridilo, disminuyen cuantitativamente las clorofilas a y b, predominando después los pigmentos amarillos; desciende la actividad metabólica, apareciendo plastoglóbulos osmiófilos, en un proceso similar al de envejecimiento, aunque más rápido y variado cronológicamente, según confirman los estudios de BAUER (1969) y DODGE (1970).

El β -caroteno aunque protege contra la fotooxidación, disminuye según indica HARRIS y DODGE hasta un 70% a las 20 horas de ser tratado con Paraquat.

Los compuestos no nitrogenados como el Trioxone, disminuyen las clorofilas, muy intensamente el β -caroteno y violaxantina.

Los compuestos bromados como el Hyvarx y los derivados de la urea como indica MEES (1960), tienen acción similar pero retardada con respecto a la acción rápida de las sales de bupiridilo sobre los pigmentos, mientras que los derivados de las Triazinas reducen las clorofilas en un 50% marcándose el aumento del β -caroteno. ATKINS y TCHAN (1967); BALEZINA (1967); LIPNICKAJA y KRUGALOW (1967); PLATONOWA (1967); KIRKWOOD, FLETCHER y SMITH (1970); PANTERA (1970).

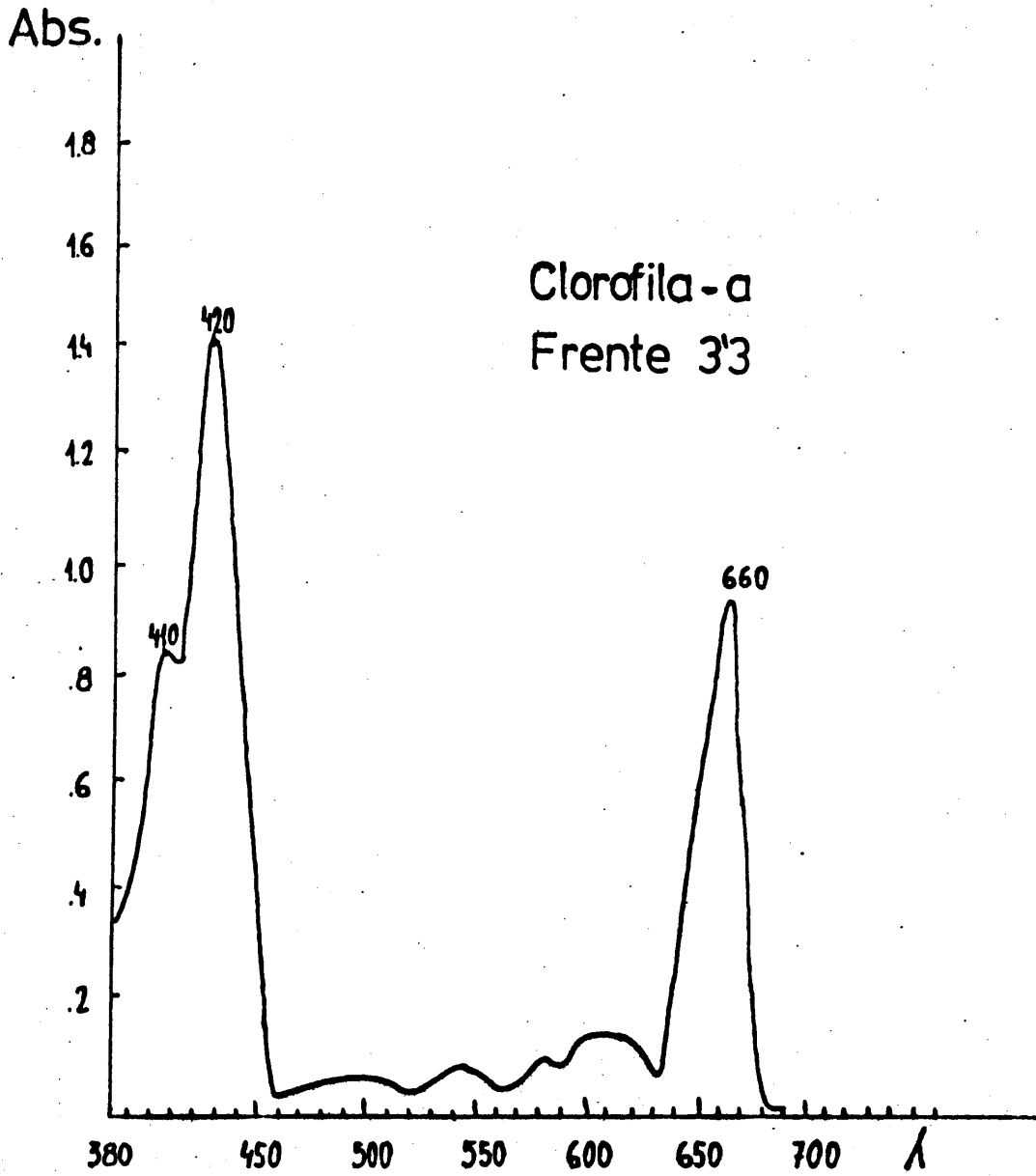


Fig. 14.- Absorción del espectro de clorofila-a.
Frente = 3,3.

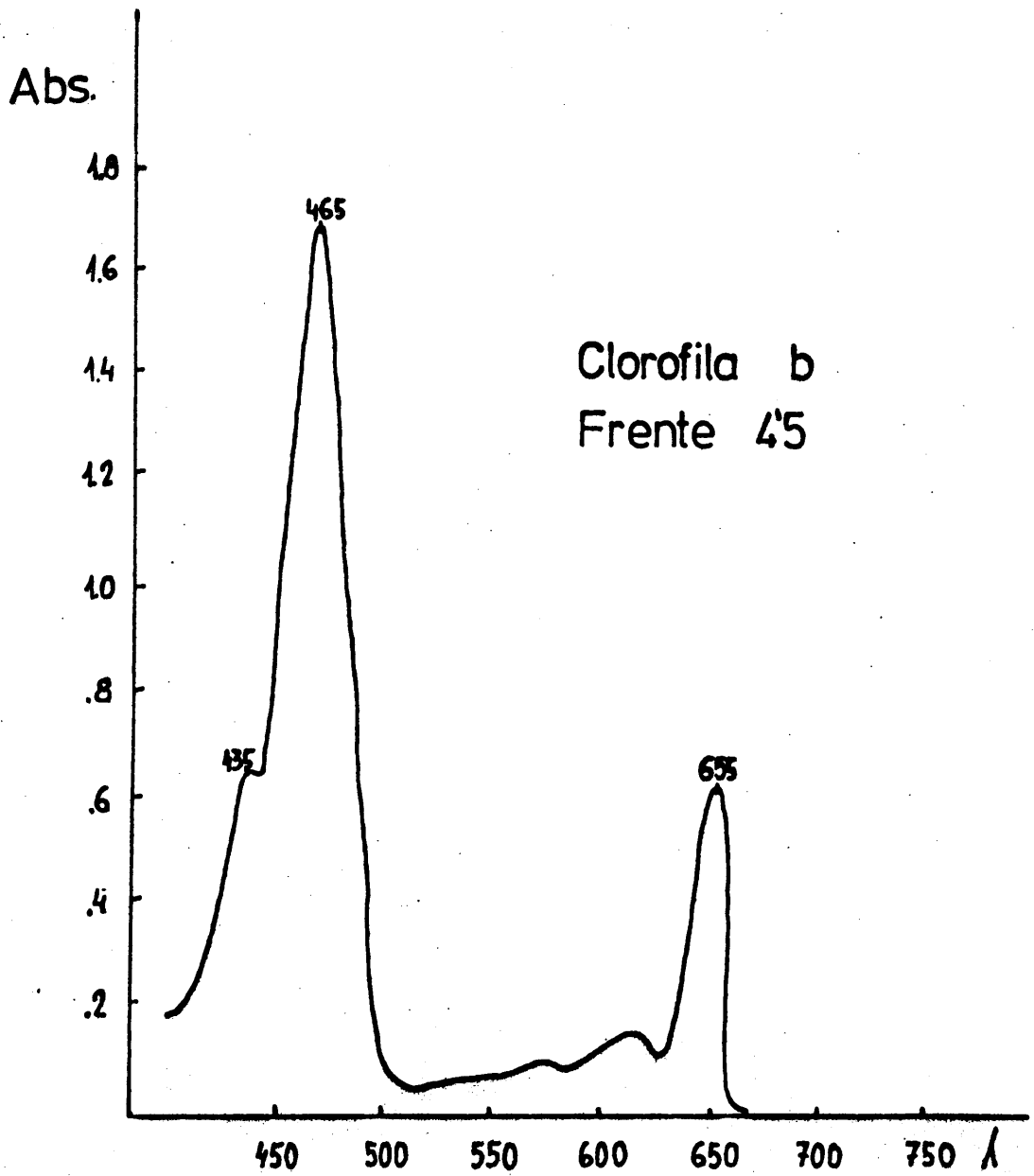


Fig. 15.- Absorción del espectro de clorofila b.
Frente = 4,5.

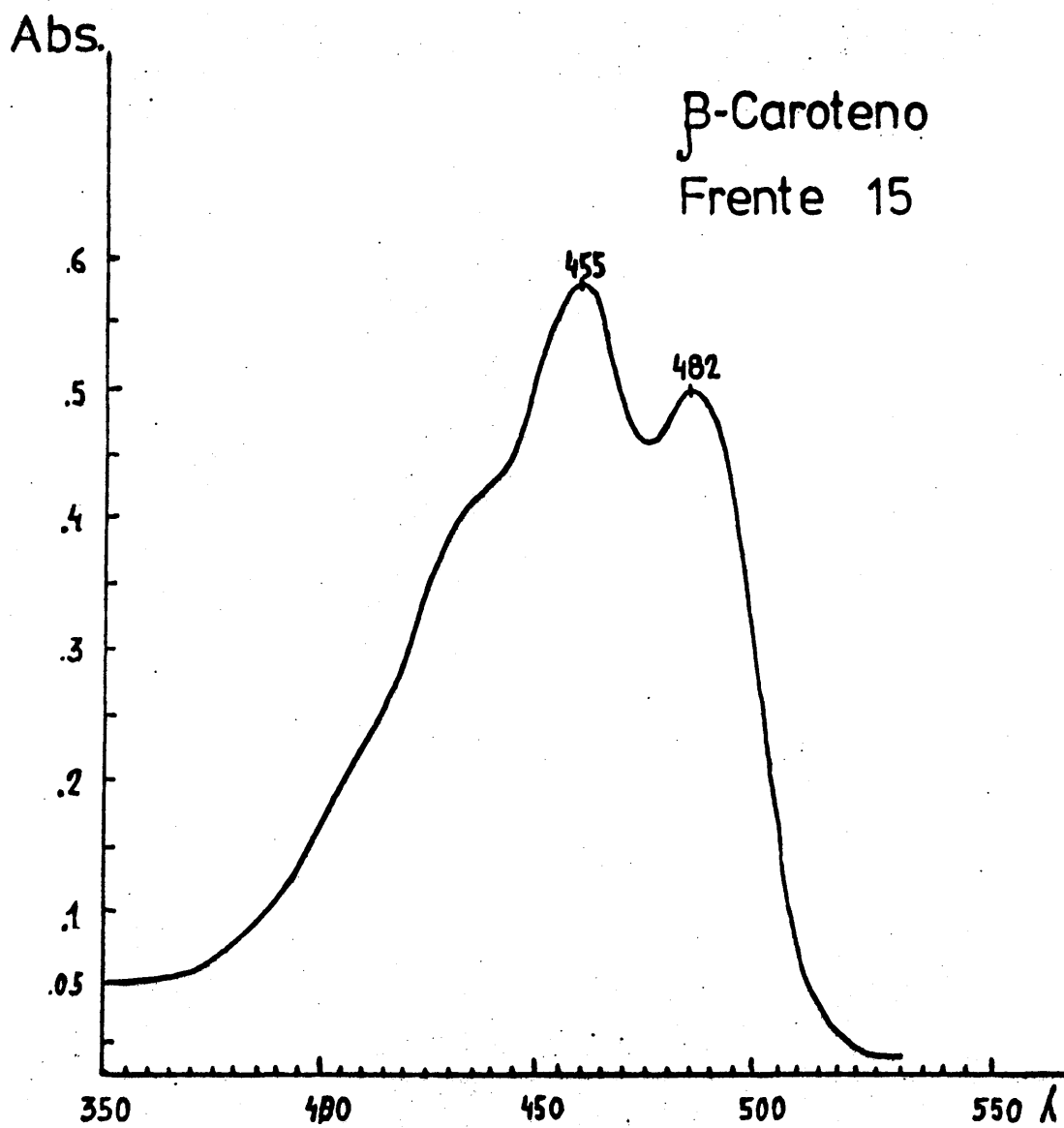


Fig. 16.- Absorción del espectro de β -caroteno.
Frente = 15.

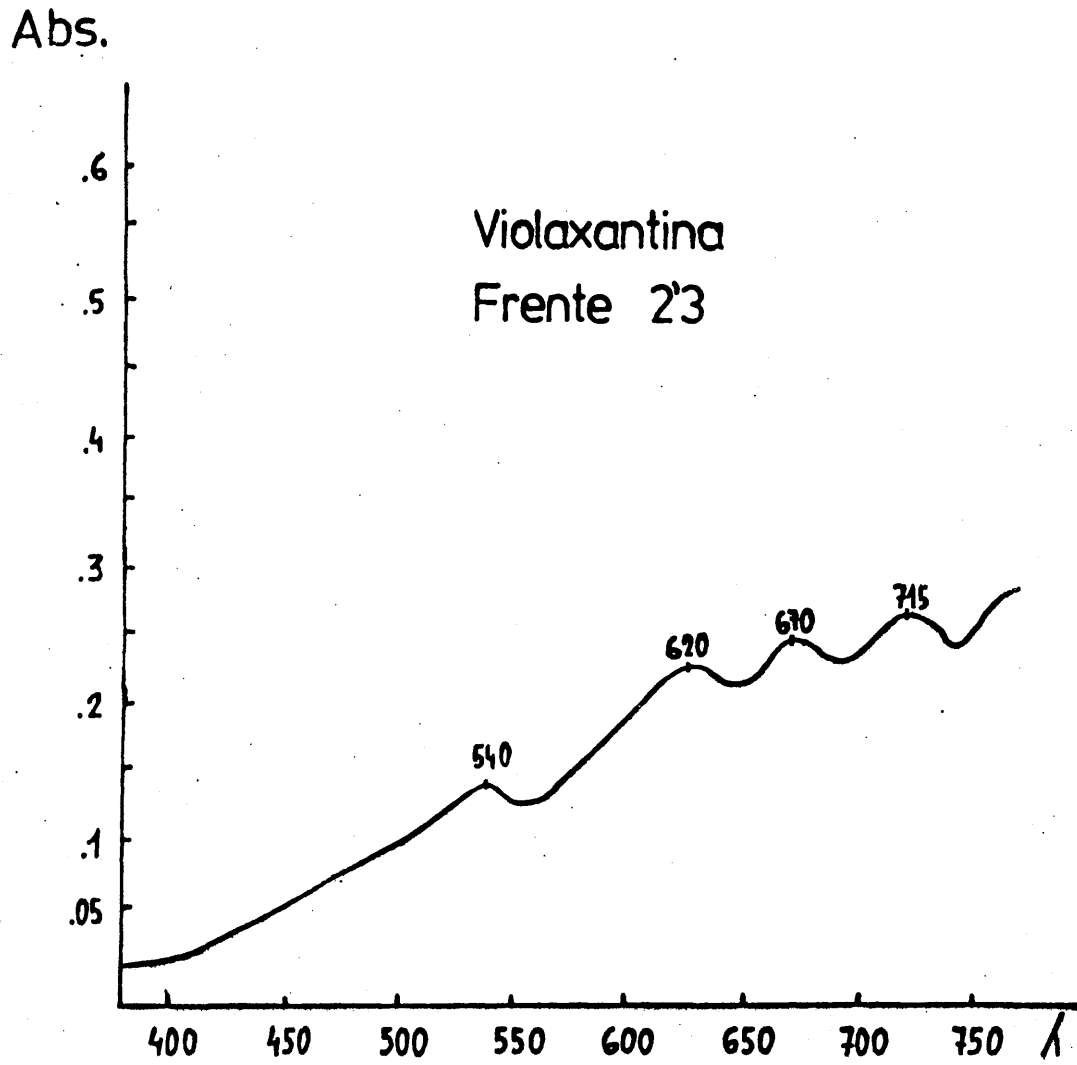


Fig. 17.- Absorción del espectro de Violaxantina.
Frente = 2,3.

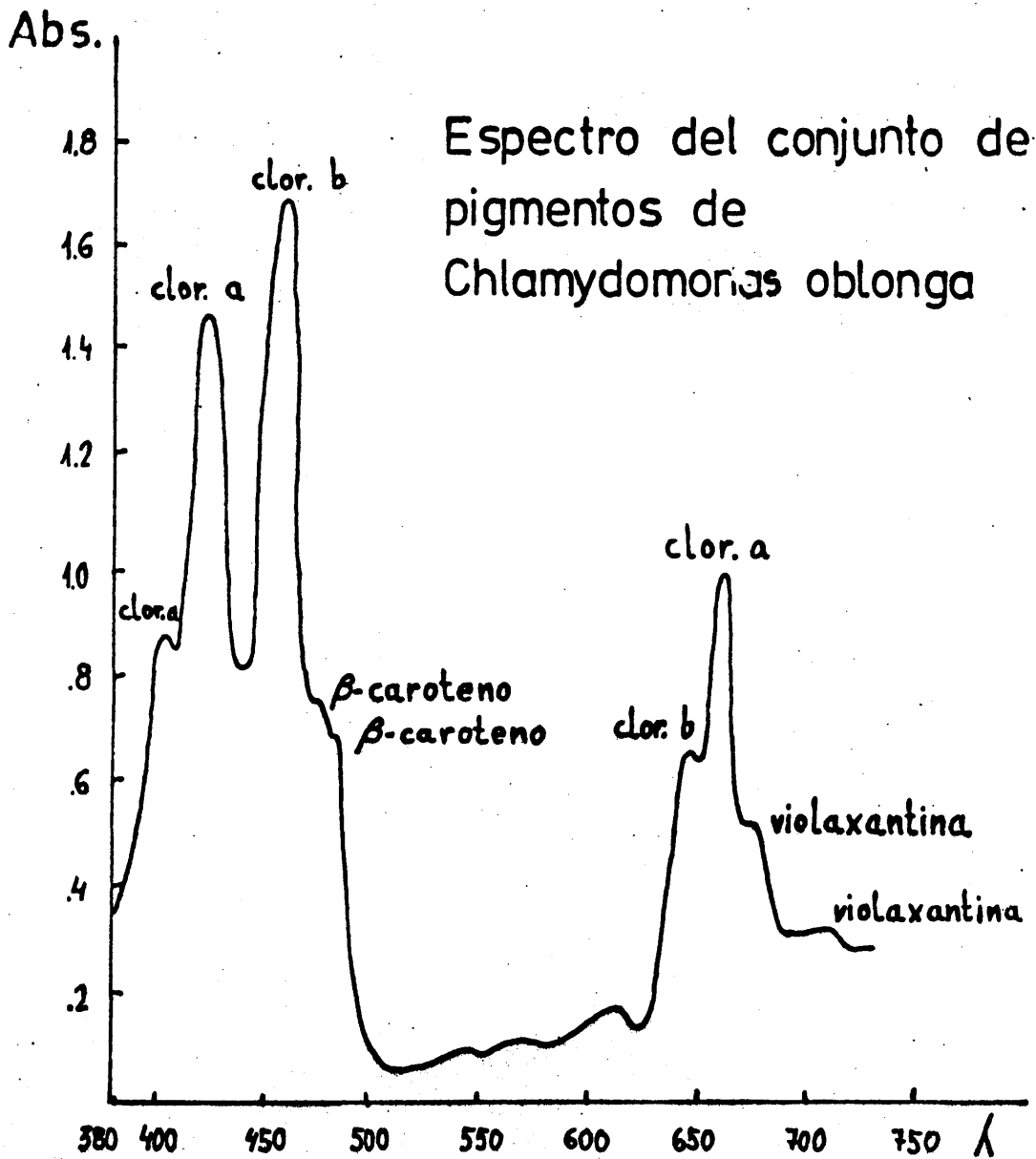


Fig. 18.- Absorción del espectro del conjunto de pigmentos de *Chlamydomonas oblonga* crecidas en medio control.

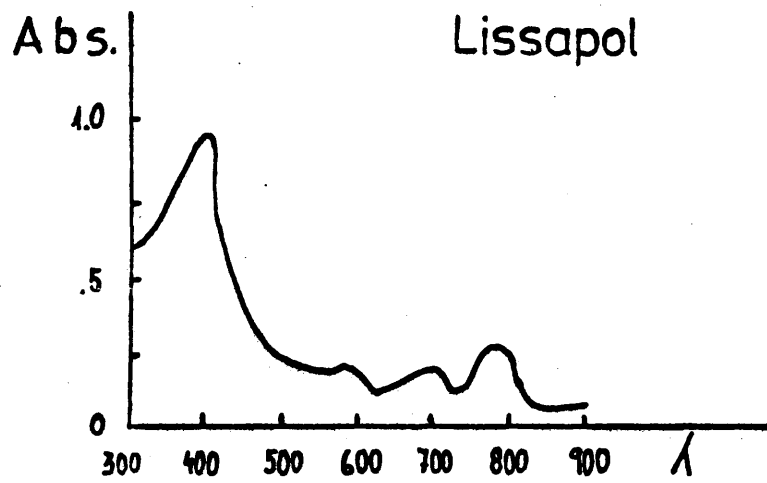


Fig. 19.- Absorción del espectro del conjunto de pigmentos de Chlamydomonas oblonga crecidos en medio conteniendo Lissapol.

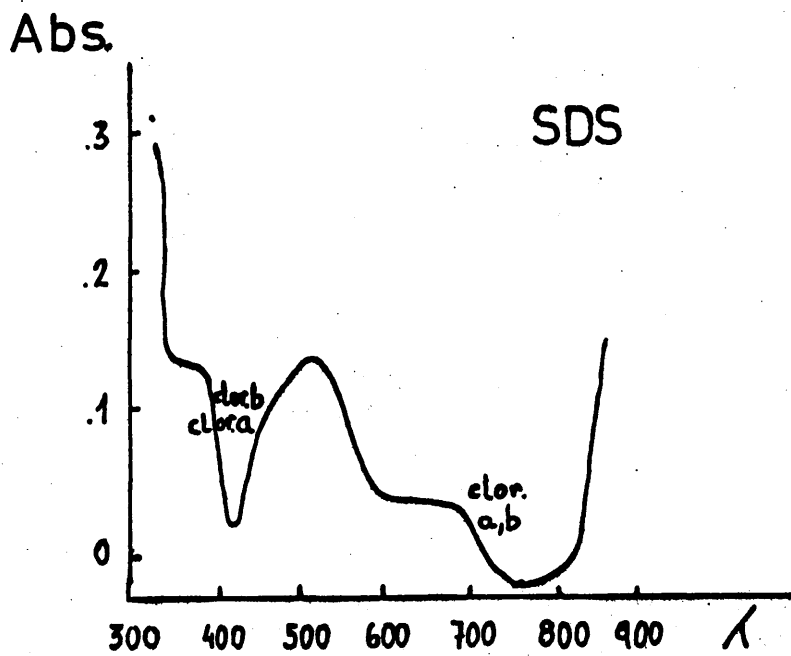


Fig. 20.- Absorción del espectro del conjunto de pigmentos de Chlamydomonas oblonga crecidos en medio conteniendo SDS.

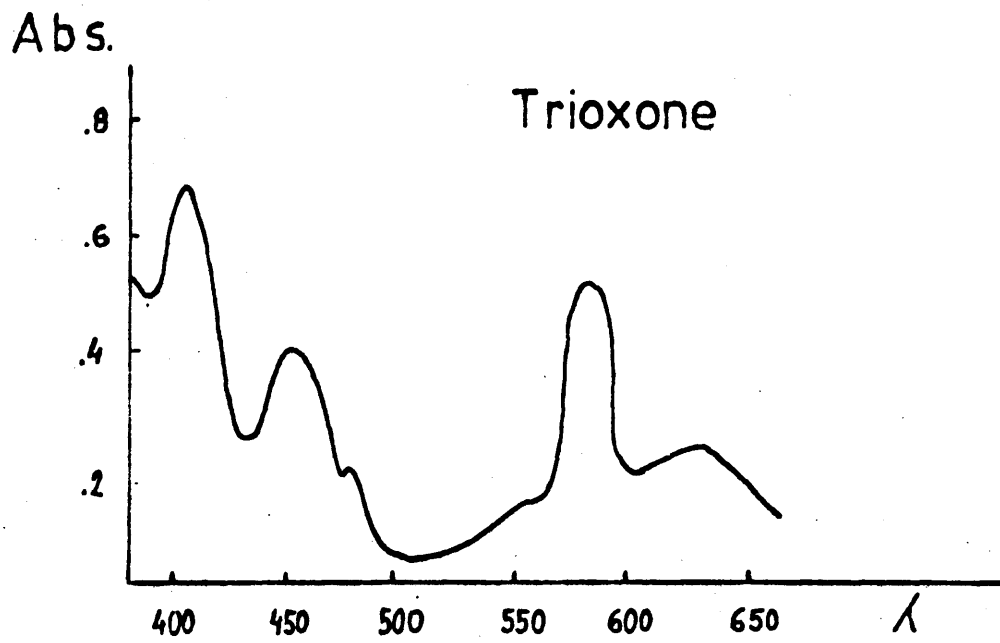


Fig. 21.- Absorción del espectro del conjunto de pigmentos de Chlamydomonas oblonga crecidos en medio conteniendo Trioxone.

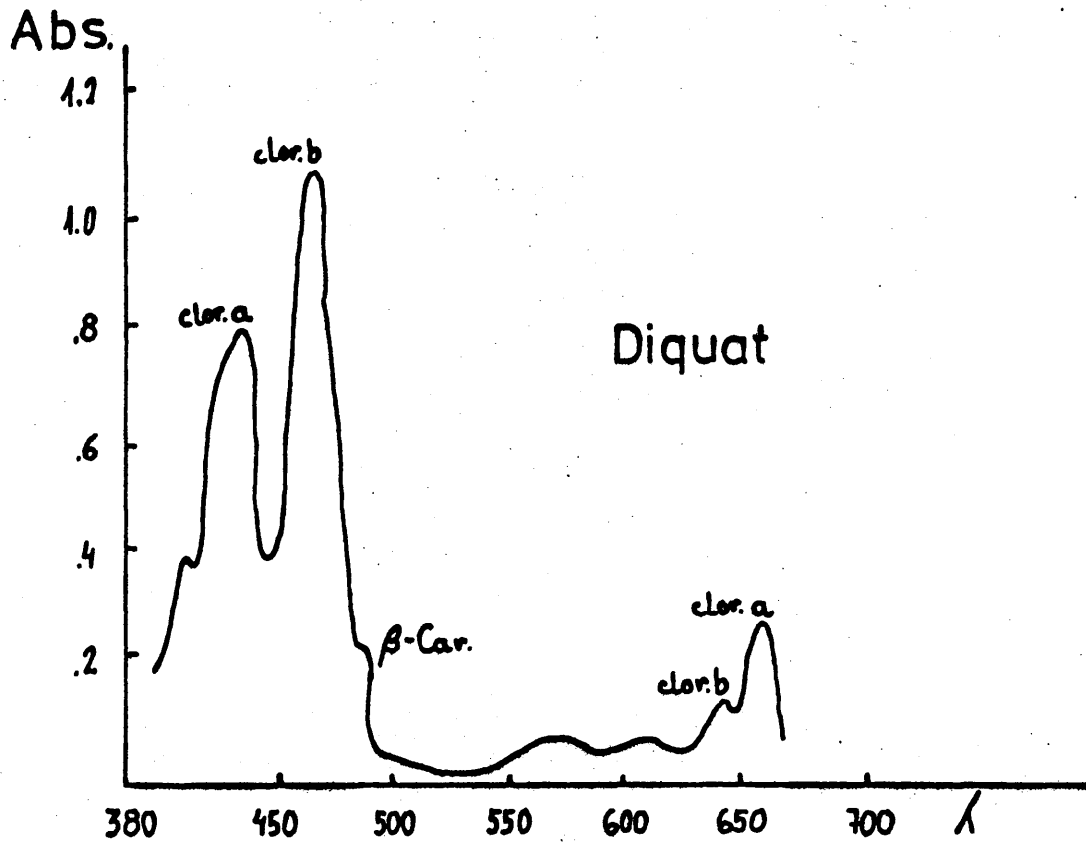


Fig. 22.- Absorción del espectro del conjunto de pigmentos de Chlamydomonas oblonga crecidos en medio conteniendo Diquat.

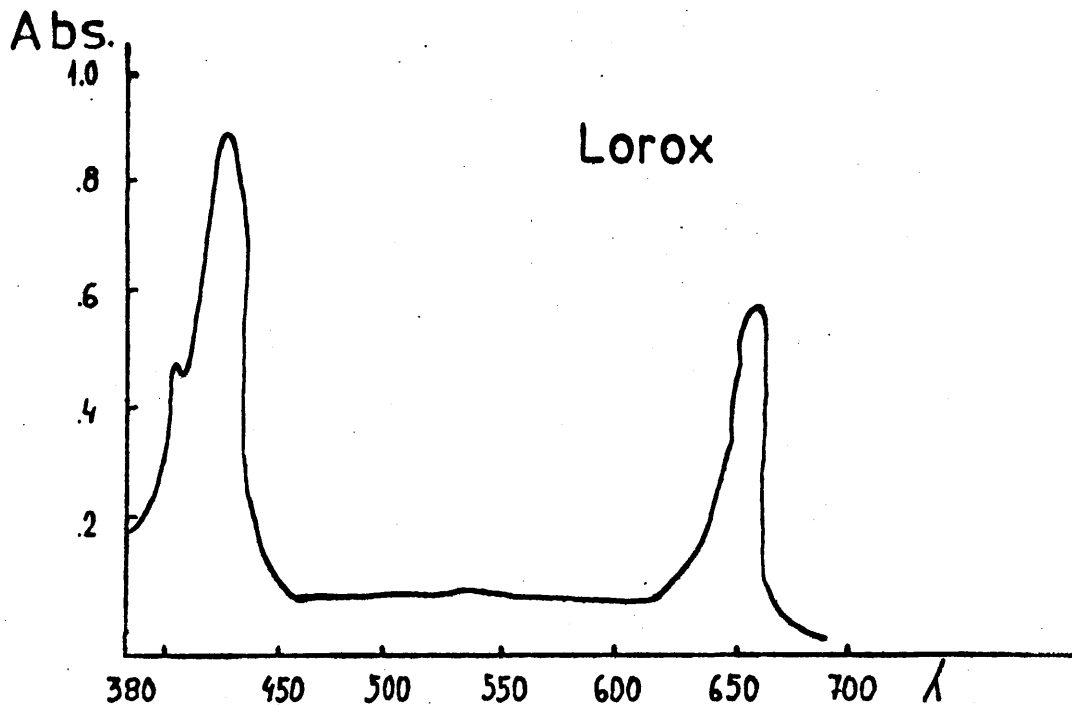


Fig. 23.- Absorción del espectro del conjunto de pigmentos de Chlamydomonas oblonga crecidos en medio conteniendo Lorox.

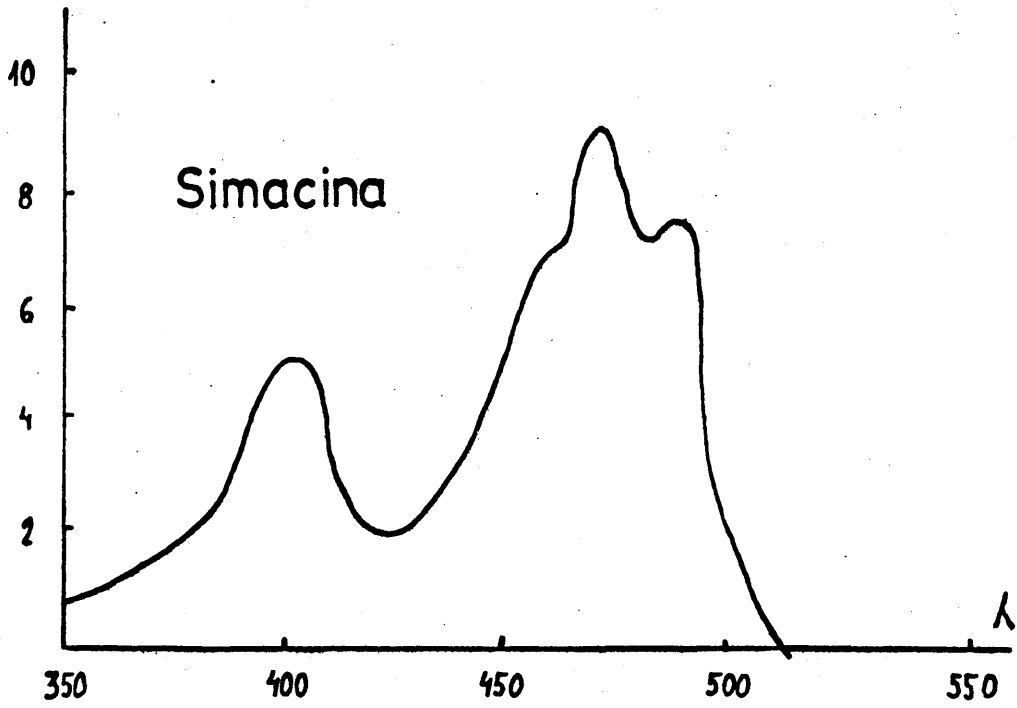


Fig. 24.- Absorción del espectro del conjunto de pigmentos de Chlamydomonas oblonga crecidos en medio conteniendo Simacina.

V.4. ULTRAESTRUCTURA DE CHLAMYDOMONAS OBLONGA

a) Control

Este organismo, cultivado en medio líquido de Proteosa-Peptona, sin tratamiento especial ninguno, durante 48 horas a temperatura ambiente e iluminación constante, fue fijada con Glutaraldehído al 3% durante 2 horas; posteriormente, en OsO_4 , durante una hora a $0^\circ C$ y otra hora más a temperatura ambiente, utilizando siempre tampón fosfatos a pH de 7,3.

La inclusión se efectuó en resina epoxi "Araldita".

Las observaciones de los cortes realizados en estas inclusiones que fueron vistos en un Microscopio Zeiss E.M. 9a Phylips son las que corresponden a las figuras de las fotografías comprendidas de la 1 a la 21 y cuya descriptiva se relata a continuación.

De acuerdo con las observaciones al microscopio óptico, se trata de una especie de Chlamydomonas, de forma ovoide, de, aproximadamente, 20 μ de diámetro, en el que se distingue la membrana celular rodeada por otra de naturaleza celulósica. Las dos terceras partes del citoplasma están ocupadas por un gran cloroplasto de forma de copa, en cuyo interior hay un pirenoide esférico rodeado por láminas de almidón. En un ángulo anterior del cloroplasto y contra la pared se encuentra el estigma.

En el tercio anterior de la célula, está el núcleo, dos vacuolas contráctiles y dos flagelos, cuya membrana externa resulta de la evaginación de la membrana celular. Son perceptibles también algunas mitocondrias apoyadas en muchas ocasiones en hundimientos del cloroplasto o bien entre éste y la membrana plasmática. El aparato de Golgi, próximo al núcleo, está representado por un apilamiento de dictiosomas. El retículo endoplasmático se encuentra localizado en una línea que corre paralela con la membrana del cloroplasto.

Vamos a describir separadamente cada uno de los elementos descritos.

- **Membrana celular.**- El citoplasma está rodeado por una membrana delgada tensa y continua, mostrando en algunos fragmentos estratificación evidente. En el polo anterior la membrana se evagina, para cubrir a los dos flagelos, mientras que en el resto de la célula sigue la curvatura de la célula. Fuera de la membrana plasmática, hay una membrana continua de menor densidad que corresponde a la membrana celulósica, la cual caracteriza a este género; estas observaciones coinciden con las llevadas a cabo por PRESTON en 1951 y SAGER y PALADE en 1956.

La membrana celulósica se encuentra estrechamente adaptada a la plasmática, o separada de ella por un espacio más o menos ancho, ocupado por un material de densidad variable, lo que prueba la independencia de estas estructuras. Finalmente la parte más externa de la pared celular, está cubierta por una tercera capa de material denso, que corresponde a la cápsula vista al microscopio óptico, de espesor variable y cuya estructura es como un fino fiel-tro con la superficie externa desflecada y constituido por partículas densas e irregulares.

- **Flagelos.**- Nacen en el polo anterior de la célula, de un cuerpo basal que resulta del acoplamiento de los dos cueros basales, uno por cada flagelo existente. En algunos cortes se puede observar la sección transversal de estos flagelos, mostrando una membrana externa que envuelve a diez pares de túbulos, uno de los cuales es de posición central. La membrana externa de los flagelos es una conti-
nuación de la plasmática.

- **Sistemas de membranas del citoplasma.**- Hay dos sistemas de membranas en el citoplasma del género Chlamydomonas oblonga: uno consta de túbulos y vesículas intercomunica-
das, la mayor parte de las cuales se asocian con pequeñas partículas densas, que corresponden por su morfología y localización al retículo endoplasmático de la célula ani-
mal. El otro sistema está representado por apilamientos compactos de vesículas laminares próximas al núcleo y que

como señalan SAGER y PALADE, DALTON (1954), HAGUENAU (1955), pueden representar a los dictiosomas de las células animales, principalmente de los invertebrados, SJÖSTRAND (1954).

Estos dos sistemas de membranas, presentan comunicaciones entre sí, que permiten el paso de sustancias a su través, por lo que se les puede considerar como el sistema circulatorio del citoplasma, de acuerdo con lo que señalan PALADE y SAGER (1957).

- Retículo endoplasmático.- Está representado en cortes longitudinales por perfiles que constan de una delgada membrana limitante y un espacio vacío sin estructura interna o con ella. A esta membrana se asocian partículas pequeñas y densas, que deben representar a los ribosomas. En otros géneros de Chlamydomonas, este retículo no tiene orientación fija, mientras que en el que nosotros describimos, está en el tercio anterior del organismo, paralelamente dispuesto al borde anterior del cloroplasto.

Además de las partículas próximas a la membrana del retículo endoplásmico, hay otras de naturaleza similar esparcidas a través del citoplasma, individualizadas en cadenas o en racimos.

- Dictiosomas.- Son formas alargadas de superficie suave, limitadas por membranas densas y con un estrecho espacio entre ellas, orientadas paralelamente y próximas al núcleo. Corresponden a las vesículas planas relativamente grandes y elementales señaladas por SAGER y PALADE (1957) en Chlamydomonas reinhardi y por GATENBY (1955). El extremo de estas vesículas está dilatado en forma de ampollas. El conjunto de estos perfiles está rodeado por multitud de elementos ovales o circulares de unos 30 a 50 nm, en contacto o separadas de las cisternas. Estos apilamientos son semejantes a las estructuras descritas en células animales como aparato de Golgi por DALTON (1954) y otros autores.

En Chlamydomonas oblonga existen cinco cisternas por sección en torno al núcleo, asociadas con vesículas.

- Mitocondrias.- Tienen forma de bastón, semejantes a las de los tejidos animales, rodeadas de una doble membrana. La interna se invagina formando las crestas mitocondriales, cuya orientación varía respecto a la de los animales, por no estar orientadas perpendicularmente al eje longitudinal, razón por la que las mitocondrias presentan crestas tanto en secciones transversales como en longitudinales. Su número también menor que en las células animales, varía con el estado físico de la célula, según señala PALADE (1953) y SAGER y PALADE (1957). En algunas circunstancias los cortes presentan mitocondrias entre los lóbulos de las lamelas del cloroplasto por estar situada sobre el mismo o entre el cloroplasto y la membrana plasmática. PITELKA (1963).
- Vacuolas.- Aparecen entre el núcleo y la cara cóncava del cloroplasto en número variable. Se reconocen por su alta densidad debida a una serie de cuerpos de gran polimorfismo embebidos en la matriz.

Las dos vacuolas contráctiles que se describen mediante el microscopio de contraste de fases, no son claramente observables.
- El núcleo.- Localizado en la concavidad del cloroplasto, aparece como un cuerpo más o menos ovoide de dos μ de diámetro. El plasma nuclear es relativamente denso, conteniendo un fino material granular embebido en una matriz amorfa, entre la cual aparece el nucleolo de posición central o próximo a la membrana, si la fijación se prolonga en exceso. La envuelta nuclear consta de dos membranas separadas por un espacio y perforadas por poros relativamente grandes de distribución irregular; la externa presenta partículas distribuidas en la superficie que está en contacto con el citoplasma.
- Cloroplasto.- Es el órgano más característico del género Chlamydomonas dado su tamaño y morfología.

Este orgánulo altamente organizado, contiene no sólo

pilas de lamelas sino también regiones diferenciadas y bien localizadas como el estigma, pirenoide y zonas conteniendo ADN, de acuerdo con los trabajos de RIS y PLAUT (1962), e IWAMURA y KUWASHIMA (1969). Estos últimos autores, usando el método del CsCl, dan una proporción de 33 a 36% de guanina-citosina, en las áreas del cloroplasto.

La existencia de una estructura interna en el cloroplasto, ha sido descrita en varios estudios por numerosos investigadores, como RABINOWITCH, WEIER, STOCKING, FREY-WYSSLING, MUHLETHLER y GRANICK.

Ya en 1880 estos plastos eran descritos como corpúsculos oscuros llamados "grana" rodeados por un claro estroma. A partir de entonces y a la luz del microscopio óptico, se propusieron numerosas teorías, destacando dos hechos fundamentales: Presencia de grana en las plantas superiores pero no en las algas, y en cambio una gran birrefringencia del cloroplasto que delata su estructura lamelar.

La evidencia de la organización lamelar del cloroplasto se debe al microscopio de polarización, siguiendo las observaciones de SCARTH (1924) sobre la birrefringencia y dicroísmo del cloroplasto.

Actualmente los estudios sobre este orgánulo se completan a la luz del microscopio electrónico. Se trata de una estructura heterogénea, constituida por pequeños gránulos llamados grana, incluidos dentro del estroma. Los grana están formados por vesículas aplanadas que aparecen como densas bandas paralelas a la superficie del cloroplasto. La estructura interna varía considerablemente entre algas y plantas superiores, pero en ambos casos la estructura básica está compuesta por finas membranas más o menos continuas que en las algas verdes forman sacos aplanados llamados por STEINMANN y SJÖSTRAND en 1955 discos, formados por dos membranas unidas en sus extremos, sin constituir apilamientos y que recorren el cloroplasto en toda su extensión. En los vegetales superiores, los discos se super

ponen a manera de pilas de monedas, constituyendo los grana que se comunican por medio de túbulos llamados intergrana. En uno y otro caso existe una matriz de baja densidad dentro de la cual se encuentran estas láminas, alternando con granos de almidón y otros de naturaleza lipídica.

Estudios recientes sobre la ultraestructura de los grana, muestran que están formados por compartimientos superpuestos cerrados a los que se designa con el nombre de tilacoides, cuyo número varía según las especies entre 5 a 50 o más.

En el género Chlamydomonas oblonga las lamelas tienen una configuración particular, ocupando generalmente la mayor parte del cloroplasto, diseminadas en zonas que contienen una materia de finos gránulos y a veces entre cuerpos homogéneos que corresponden a granos de almidón. Las lamelas aparecen en parejas constituyendo vesículas cerradas llamadas discos, que se apilan en número variable (2 a 20 unidades) e irregularmente distribuidos en el cloroplasto.

En los trabajos de GOODENOUGH, ARMSTRONG y LEVINE (1969) los discos encontrados en Chlamydomonas reinhardi, mutante "ac-31", corresponden a membranas tilacoides de alta actividad en la segunda fase de la fotosíntesis. SCHOR, SIEKEWITZ y PALADE (1970) encuentran estas mismas membranas en la forma silvestre de la citada especie. En nuestro caso los discos que integran los grana, pueden por su ultraestructura corresponder a tilacoides, pues están constituidos por pares de membranas unidas en sus extremos, conteniendo lipoides, pigmentos fotosintéticos y citocromos.

La presencia de discos apilados a manera de grana en el cloroplasto de Chlamydomonas alga filogenéticamente muy lejana a las plantas superiores puede representar un estado de transición, en la evolución entre el contenido lamelar no grana típico de las algas, y el de las plantas superiores con su usual uniformidad y regular disposición

de sus grana.

En cuanto al significado funcional de los discos lamelares, los autores se han preguntado si se trata de unidades estructurales dentro del cloroplasto con una especial misión funcional, y le han asignado tres funciones:

1) Las membranas de los discos se consideran como estructuras conductoras de energía conteniendo espacios cerrados y regularmente dispuestos de moléculas de pigmentos.

2) Como unidades fotosintéticas, según el supuesto dado por WOLKEN y SCHWERTZ (1953), para quienes el número máximo de moléculas de clorofila contenidas en un disco es de $2.4 \cdot 10^5$ para espinacas, cantidad considerablemente más alta, que la unidad fotosintética señalada por EMERSON y ARNOLD (1932) en Chlorella. No obstante, si la cantidad de clorofila por disco pudiera variar experimentalmente, podría determinarse el número mínimo de moléculas de clorofila por disco, requeridas para la actividad fotosintética.

3) Otro posible papel del disco es servir de barrera de permeabilidad.

- Matriz del cloroplasto.- Los espacios entre las lamelas han recibido el nombre genérico de estroma. El concepto de estroma como distinto de grana no es muy defendible, pues el microscopio electrónico muestra claramente que el material en las regiones intergrana no lamelares del cloroplasto, es continuo con el material que ocupan los espacios interdiscales con el grana. Se ha propuesto, por consiguiente, abandonar el término estroma y hablar sólo de una matriz continua que rodea y penetra los grana y que embebe los discos.

Hay, sin embargo, diferencias localizadas entre la matriz del cloroplasto ilustradas con la presencia de gránulos densos (presumiblemente lípidos) y pequeñas partículas (ribonucleoproteínas) en las regiones intergrana y por su ausencia en los espacios entre los discos.

- Membranas limitantes.- Sin embargo, la existencia de una membrana limitante alrededor del cloroplasto es una cuestión sujeta a estudios, micrograffias publicadas de material muy bien preservado demuestran claramente la presencia de tales membranas. En secciones bien orientadas de Chlamydomonas, se puede evidenciar que dos membranas dispuestas una junto a otra alrededor del orgánulo (confirmado en cloroplastos de plantas superiores) forman una envuelta de cloroplasto similar en su estructura y constitución general, pero diferente en detalles a la envoltura nuclear descrita por WATSON. Los cloroplastos parecen estar a veces rodeados por una vasta cisterna.

Se han observado conexiones entre la envuelta del cloroplasto y el sistema de membranas del citoplasma. Las dobles de la membrana del cloroplasto están relacionadas probablemente con estas anastomosis. Su presencia y la existencia de una cisterna entre las dos membranas del cloroplasto, hace posible la transferencia de materiales entre el sistema de vacuolas del citoplasma y plastidio sin contacto directo entre el citoplasma y la matriz del cloroplasto. En segundo lugar, la doble membrana puede ser importante en el proceso de formación lamelar (formación de las lamelas), particularmente si la lamela aparece por invaginación de la membrana interna. Es interesante que los cloroplastos y mitocondrias están rodeados por dos membranas sucesivas y es posible que en ambos orgánulos, esta disposición represente una solución común para los problemas similares. En vista de las últimas especulaciones en literatura citológica concernientes a la relación entre cloroplasto y mitocondrias, podría destacarse que a pesar de la similar estructura mencionada, no hay evidencia de una relación en el desarrollo entre estos dos orgánulos en Chlamydomonas.

- El pirenoide.- Es una región diferenciada del cloroplasto que se encuentra en la mayor parte de las algas verdes y en los primitivos hongos y musgos, pero no en las plantas

superiores. Se le considera como un orgánulo relacionado con la síntesis del almidón, ya que tiene gran cantidad de proteínas y está generalmente asociado con granos de almidón. Algunas algas, incluidas las Diatomeas, y algunos Dinoflagelados, contienen pirenoide pero no forman almidón; allí el pirenoide parece estar asociado con el almacenamiento de lípidos.

En Chlamydomonas el pirenoide no contiene lamelas y, por consiguiente, presumiblemente tampoco clorofilas. Está caracterizado por una red de túbulos embebidos en la matriz de denso material finamente granulado. La matriz del pirenoide es continua con la del cloroplasto y los túbulos se conectan con los discos del plasto circundante. Estos túbulos pueden representar un sistema para conducir productos de fotosíntesis desde las lamelas, a las regiones especializadas para la síntesis de almidón.

Aparentemente el pirenoide no es un sistema obligado, pues el almidón se encuentra almacenado también en otras regiones del plasto, entre las pilas de los discos e incluso se conocen muchos flagelados aclóricos que sintetizan almidón como Chilomonas. Sin embargo, el primer almidón formado está situado en planos que rodean al pirenoide y sólo en condiciones de acumulación aparecen granos de almidón en otros lugares. Las descripciones de pirenoides de varias algas vistos en el microscopio electrónico como los de Euglena, WOLKEN (1953), los de Spirogyra, LEYON (1953), parecen contener lamelas continuas con las del cloroplasto pero con diferente disposición. En Chlorella la situación es comparable a la encontrada por ALBERTSSON y LEYON (1954) en Chlamydomonas, quienes señalan que el pirenoide es un denso cuerpo amorfo, separado de las láminas del cloroplasto, por láminas de almidón y en el que se han notado elementos tubulares.

Teniendo presente el hecho de que las plantas superiores tienen grana, pero no pirenoide, mientras que las algas poseen pirenoide pero no grana, LEYON ha sugerido una

relación funcional y filogenética entre estos dos componentes del plasto. La situación encontrada en Chlamydomonas, la cual tiene en el cloroplasto grana particularmente diferenciados un pirenoide bien desarrollado, así como un depósito de almidón, extrapirenoidal, se puede usar como base para diferenciar la interpretación de que el grana representa un avance en la organización del disco del cloroplasto, mientras que el pirenoide es un orgánulo primitivo de síntesis de almidón, cuya función está siendo gradualmente asumida por ciertas regiones del interdisco del cloroplasto. En esta interpretación, los cambios evolutivos de los dos sistemas no están funcionalmente relacionados. Se han descrito distintos pasos evolutivos según KAJA (1954), en la desintegración del pirenoide, los cuales muestran una serie de tipos desde un pirenoide homogéneo hasta el completamente disperso por todo el cloroplasto.

- Estigma.- En el género Chlamydomonas es una región del cloroplasto altamente diferenciada, conteniendo dos o a veces más láminas de paquetes granulares de localización constante, emparedados entre discos periféricos y por ello situados en la matriz del interdisco del cloroplasto. En cada lámina los gránulos están estrechamente apretados, constituyendo una sólida barrera, para la penetración de la misma.

En Chlamydomonas, el estigma tiene misión fototáctica, es decir, se le considera como el orgánulo fotorreceptor de la célula. Sin embargo, HARTSHORNE (1953) encontró un mutante ciego en Chlamydomonas reinhardi, que no tenía estigma detectable a la luz del microscopio óptico presentando fototactismo, pero muy reducido respecto a la cepa normal. Dedujo de ello que la mancha ocular no es el único lugar de actividad fotorreceptora.

En Haematococcus, género próximo a Chlamydomonas, el pigmento de la mancha ocular ha sido identificado como astaxantina, pigmento anteriormente encontrado únicamente en los invertebrados. WALD (1953).

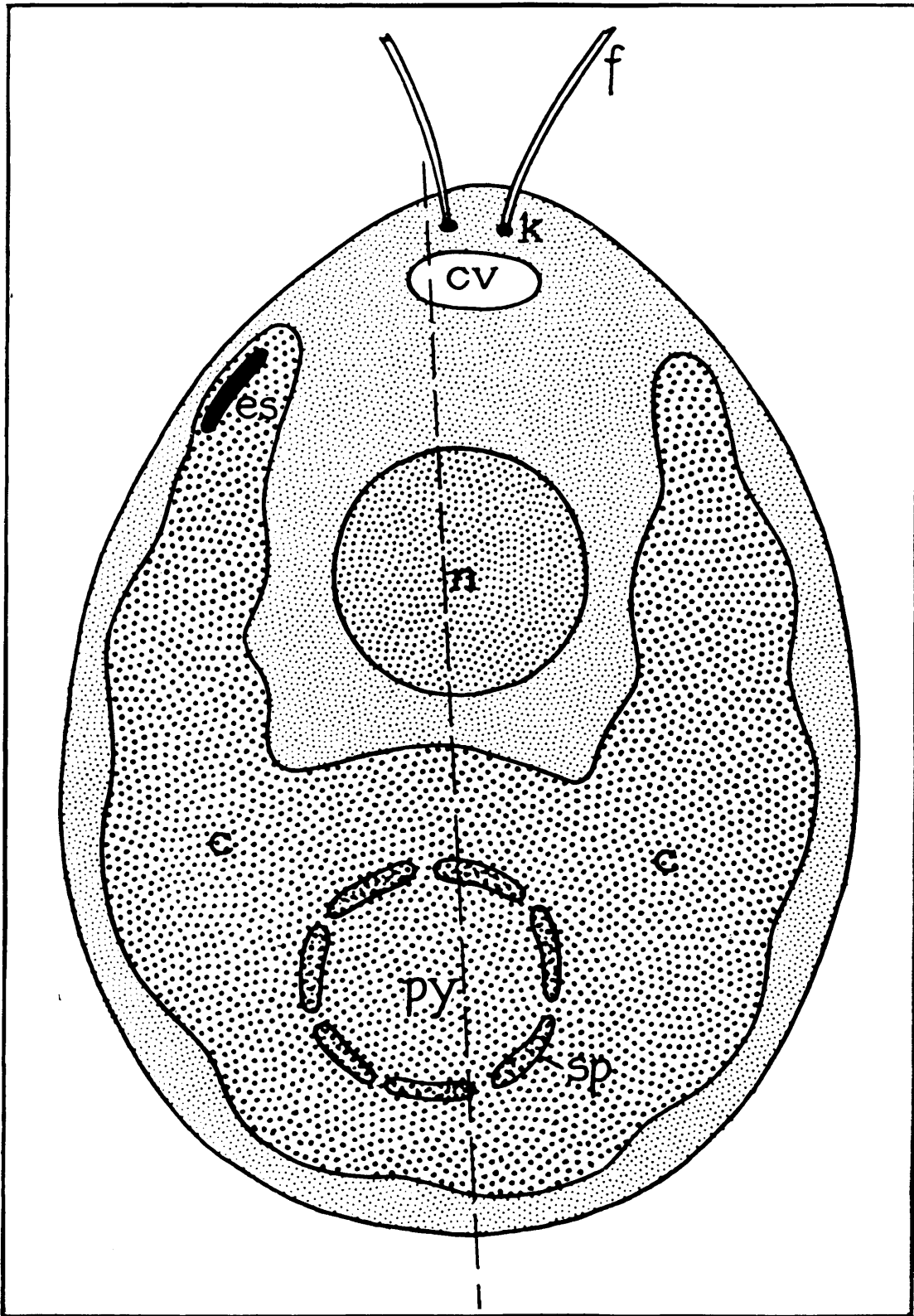
Aparentemente los carotenoides han sido asociados con la fotorrecepción de los primeros tiempos de la evolución.

- ADN contenido en el cloroplasto.- RIS y PLAUT (1968) encontraron en Chlamydomonas moewusii a la luz del microscopio electrónico y por diversos métodos citoquímicos, la presencia de ADN.

Mediante el reactivo de FEULGEN y por la Acridina-orange, indicaron la presencia en el cloroplasto de una o más formas irregulares conteniendo ADN, generalmente en la vecindad del pirenoide. Por microscopía electrónica se reveló la presencia de microfibrillas de 25 Å en estas áreas que corresponden a macromoléculas de ADN, con respecto a su localización, morfología y sensibilidad para la digestión de ADN. La posibilidad de que este material forme parte del sistema genético del cloroplasto y la hipótesis de que este organoide presente un desarrollo endosimbiótico ha sido objeto de discusión entre numerosos investigadores: FAMINTZIN (1907) y MERESCHKOWSKI (1905) en algas azules; LEDERBERG (1952); DEKEN-GRENSON y MESSIN (1958); GEITLER (1959); IWAMURA'S (1960). Al parecer RIS y PLAUT confirman tales aseveraciones.

FOTOGRAFIAS

Fot. 1.- Esquema de la morfología de Chlamydomonas, tomado del trabajo original de SAGER y PALADE (J. Biophysic and Biochem. 1957 Vol. 3). c = cloroplasto; es = estigma; py = pirenoide; n = núcleo; cv = vacuola contáctil; k = gránulo basal de un flagelo; f = flagelo; sp = zonas de condensación de almidón delimitando al pirenoide.



FOTOGRAFIA 1

FOTOGRAFIA 2

Fot. 2.- Fotografía electrónica a medianos aumentos de un corte de Chlamydomonas oblonga fijada con OsO_4 e incluida en Araldita.

Se distingue bien el núcleo en posición típicamente excéntrica con un nucleolo central y una doble membrana, en la que se observan zonas de adhesión que constituyen el substrato morfológico de los poros nucleares. Entre ambas se observa un espacio sólo interrumpido por las citadas zonas de adhesión. La mayor parte del volumen de estas células está ocupada por el cloroplasto que de modo típico, presenta el pirenoide en situación central y a causa de la fijación y deshidratación, aparece muy condensado y separado por un espacio claro de las membranas del cloroplasto, con el que se comunica por medio de algunos puentes membranosos que estudiaremos en fotografías posteriores.

En el citoplasma no ocupado por el núcleo ni por el cloroplasto se puede observar abundante cantidad de ribosomas y vacuolas con material de reserva de carácter heterogéneo. Por fuera, rodeando a la membrana celular, observamos una gruesa cápsula, de material poco denso al paso de los electrones.

Negativo n° 12.063.

Aumento inicial 6.000.

Aumento final 22.200.

n = núcleo

cr = cromatina

re = retículo endoplásmico

go = golgi

mi = mitocondria

La = lamela

c = cloroplasto

ma = matriz del cloroplasto

pi = pirenoide

cp = cápsula

v = vacuola

av = área vacía



FOTOGRAFIA 2

FOTOGRAFIA 3

Fot. 3.- Fotografía electrónica de una sección de células en división, de Chlamydomonas, en la que se observa la típica disposición del aparato de Golgi, formado por cinco sáculos tubulares, que a ambos lados tienen algunas vesículas dilatadas. También se observa en el citoplasma una gran abundancia de ribosomas agrupados en polirribosomas y elementos tubulares del retículo endoplásmico rugoso.

En la Chlamydomona que se observa parcialmente, en la parte superior de la fotografía, aparece un tubo del retículo endoplásmico rugoso, cortado a lo largo, asimismo una mitocondria muy larga, densamente teñida, con crestas de dirección paralela a su eje mayor (como se describe anteriormente).

Negativo n° 10.447.

Aumento inicial 18.000.

Aumento final 57.600.



FOTOGRAFIA 3

FOTOGRAFIA 4

Fot. 4.- De la otra célula, que aparece en la fotografía 3, mostrando el aparato de Golgi; por encima y a la derecha del mismo, un elemento tubular del retículo endoplásmico rugoso formado por membranas que tienen adosados ribosomas. La orientación de este elemento tubular paralela al borde cóncavo del cloroplasto, ha sido descrita como típica de las especies Chlamydomonas globosa y Chlamydomonas oblonga.

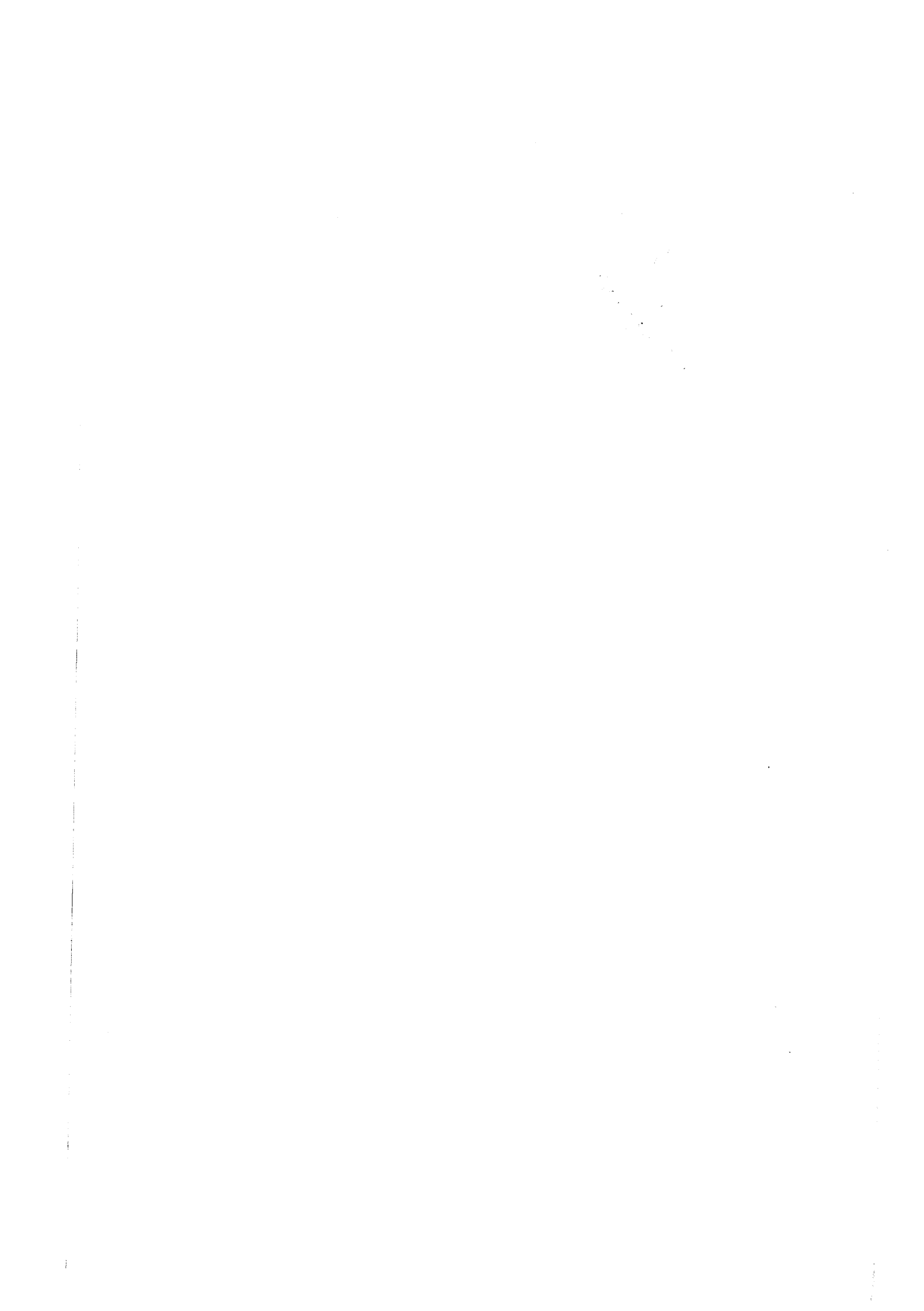
Negativo n° 10.448.

Aumento inicial 18.000.

Aumento final 63.000.



FOTOGRAFIA 4



FOTOGRAFIA 5

Fot. 5.- Fotografía electrónica a grandes aumentos, mostrando claramente una mitocondria de matriz no tan densa como la observada en fotografías anteriores, con crestas tubulares, que aparece entre los grupos de lamelas del cloroplasto, aunque esta localización de las mitocondrias puede parecer atípica.

Negativo nº 10.440.

Aumento inicial 11.000.

Aumento final 33.000.



FOTOGRAFIA 5

FOTOGRAFIA 6

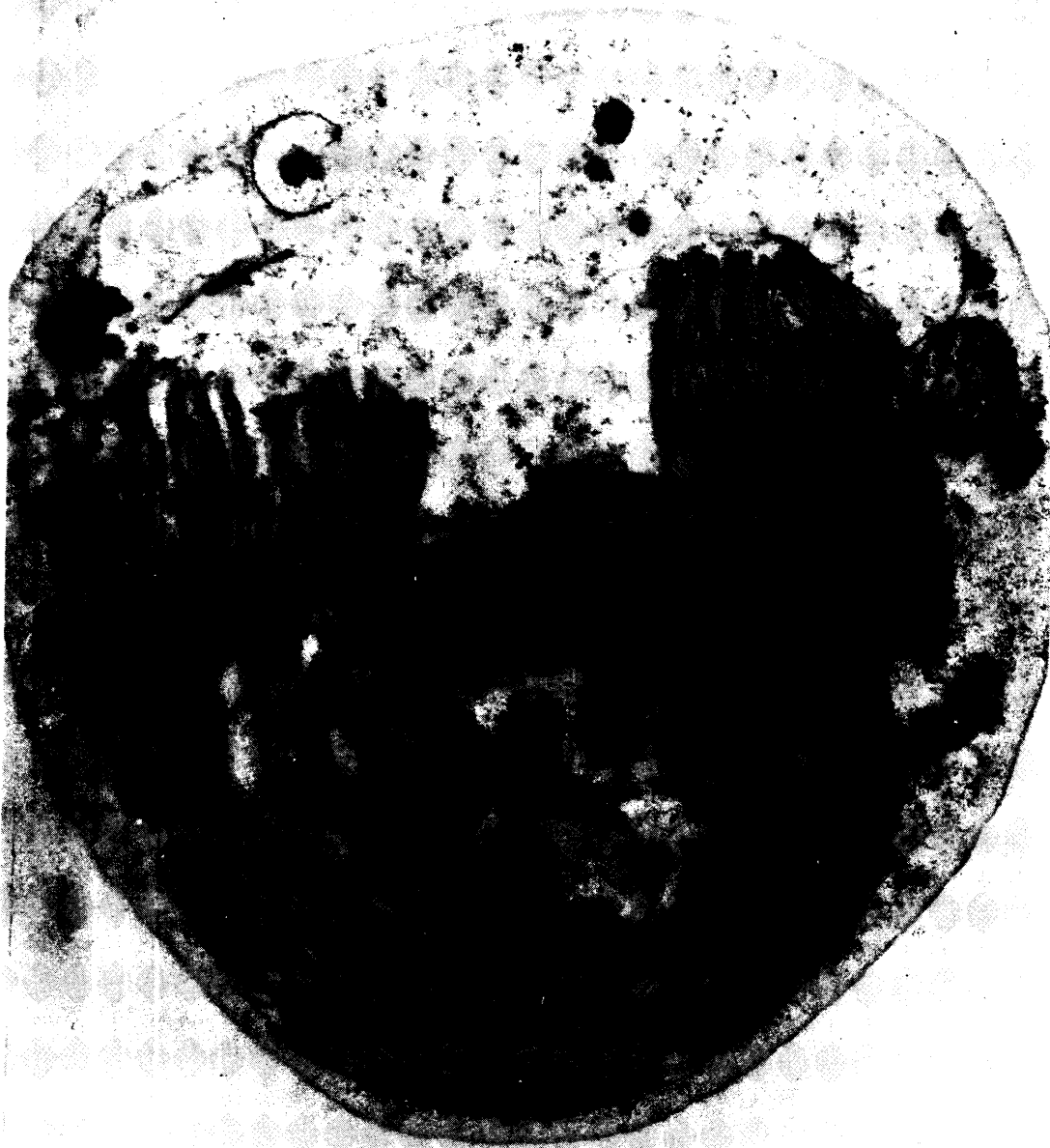


Fot. 6.- Fotografía electrónica de un corte de Chlamydomonas oblonga en la que se observa muy bien la típica disposición en forma de copa del cloroplasto. Asimismo, es muy llamativa la disposición de las lamelas formando zonas de mayor condensación que recuerdan mucho a los grana.

Negativo nº 12.062.

Aumento inicial 6.000.

Aumento final 25.800.



FOTOGRAFIA 6

FOTOGRAFIA 7

Fot. 7.- Fotografía electrónica de una vista general de la región perinuclear. El núcleo está rodeado por una doble membrana con pequeño espacio perinuclear. En algunas zonas de la membrana externa se observan ri bosomas. En el interior, la cromatina aparece en al gunas zonas ordenada en círculos, imágenes que re- cuerdan a los poros nucleares.

Negativo nº 12.057.

Aumento inicial 64 mA.

Aumento final x 3,5,



FOTOGRAFIA 7

FOTOGRAFIA 8

Fot. 8 .- Fotografía en la que se observa bien la caprichosa disposición circular de los acúmulos de lamelas del cloroplasto, que forma un intrincado retículo, cuyos espacios vacíos están ocupados por el material hidrocarbonado y por otros organoides del citoplasma.

Negativo nº 12.059.

Aumento inicial 6.000.

Aumento final 22.200.



FOTOGRAFIA 8

Para observar las modificaciones ultraestructurales producidas por los antibiológicos elegidos, hemos procedido ba
jo las mismas condiciones que en los controles.

En la descriptiva de las siguientes fotografías, que corresponden a la acción de herbicidas y detergentes, sobre los organoides citoplasmáticos, principalmente cloroplastos y sistemas de membranas, podemos observar:

Los detergentes actúan por su gran poder tensoactivo, li
sando los sistemas de membranas y componentes ribosómicos citoplasmáticos, vacuolizando el protoplasma. Estas vacuolas aparecen rellenas de productos del catabolismo celular. Destruyen el sistema de pigmentos con la consiguiente dismi
nución de la actividad fotoquímica de acuerdo con lo indica
do por NEWTON (1963), en sus estudios sobre la acción del SDS sobre cromatóforos bacterianos.

En cuanto a la acción de los herbicidas, las fotografías electrónicas tomadas de cloroplastos tratados con sales de bupiridilo, muestran que transcurridas seis horas se producen cambios en los sistemas de membranas; ciertos orgánulos como los cloroplastos, mitocondrias y núcleos son alterados, ya que normalmente están contenidos dentro de dos membranas: la plasmática que se adhiere a la pared celular y la que li
mita a cada organoide.

Estas mismas sales actúan separando a la membrana plasmá
tica de la pared celular; los cloroplastos se retraen, pero la estructura tilacoide varía muy poco y lo mismo les sucede a las mitocondrias.

Los cambios mayores de la estructura celular se deben en gran parte al escape del contenido vacuolar que, al liberar sus enzimas hidrolíticas, por alteración de las membranas limitantes de las vacuolas, así como por la ulterior produ
cción de radicales libres debidos al transporte de electrones fotosintéticos, tienen un alto papel tóxico sobre todo en condiciones de iluminación.

Estudios hechos sobre la ultraestructura de células de los cotiledones de lino muestran una progresiva y espectacu

lar destrucción de los orgánulos celulares, según afirma DODGE (1971). La mitocondrias, tras 6 horas de tratamiento se rompieron por el hinchamiento sufrido al cambio de la presión osmótica. La estructura ordenada de los tilacoides de los cloroplastos, mostró una desintegración progresiva más clara a medida que los cotiledones perdían su clorofila. Al mismo tiempo, en los cloroplastos en trance de romperse, se formaban plastoglóbulos osmiófilos, los cuales aunque también son visibles en cloroplastos de hojas normales, son característicos de ellas en estado senil. Probablemente representa una acumulación de lípidos liberados al romperse las membranas de los tilacoides y otras sustancias lipoideas según afirma LICHTENTHALER, (1968).

Por otro lado, se ha visto que el daño producido en el mesófilo celular de ciertas leguminosas, tratadas con Paraquat era el mismo a la luz que a la oscuridad, aunque, en general, la acción antibiológica de estos herbicidas se retarda en ausencia de luz, siendo los síntomas típicos del amarilleamiento foliar que siguen a la destrucción de la clorofila más rápidos que en el proceso de vejez, según afirma BAUR (1969).

A continuación describimos los efectos producidos por los detergentes y herbicidas a la vista de las fotografías electrónicas correspondientes.

FOTOGRAFIA 9

Fot. 9 .- Fotografía electrónica panorámica de una sección de Chlamydomonas tratadas con el detergente Fenopón T77 (N-metil-oleil-aurida). Las tres células que aparecen fotografiadas están modificadas, en su ultraestructura normal, como fácilmente se aprecia por la comparación de las dos fotografías siguientes con las del control.

En primer lugar, la cápsula se encuentra muy disminuida en su consistencia, habiendo desaparecido en algunas zonas.

En segundo lugar, el material que por condensación formaba el pirenoide, ha desaparecido también, o se encuentra disminuido y muy modificado respecto a su apariencia normal. Así mismo, las lamelas del cloroplasto no se visualizan.

Negativo nº 11.407.

Aumento inicial 23.000.

Aumento final 80.500.



FOTOGRAFIA 9

FOTOGRAFIA 10

Fot. 10.- Fotografía electrónica de una sección de Chlamydomonas tratada con el detergente Fenopón T77, en la que se observa en algunas zonas la gran disminución y completa desaparición en otras, del material de la cápsula. En el interior se ha producido una considerable destrucción de las estructuras membranosas, de forma que en el centro de la misma aparece un área extensa y homogénea de muy difícil enfoque, a pesar de los diversos intentos de objetivar en ella alguna estructura. Esta zona central, de aspecto lechoso y desenfocado, está en continuidad con un material periférico menos modificado de aspecto granular que no recuerda en nada a la fina organización del material testigo. En el polo superior observamos el núcleo, que por su aspecto granular y carencia de delimitación, da la impresión de tener destruida su membrana. Estos resultados coinciden con los descritos por NEWTON en sus estudios sobre agentes modificadores de la tensión superficial.

Negativo nº 11.406.

Aumento inicial 17.000.

Aumento final 76.500.



cp

FOTOGRAFIA 10

FOTOGRAFIA 11

Fot. 11.- Fotografía electrónica paronámica de una sección de Chlamydomonas tratada por el detergente Dobane JNQ (sodiun-sulfonato con cadenas alquílicas con núcleos bencénicos).

Lo más llamativo de los resultados obtenidos con este producto es que las lamelas no se visualizan, coincidiendo este hecho con la descripción básica de la función del producto tensoactivo, el cual baja la densidad de la membrana. Incluso aquellas estructuras dependientes de la membrana celular, como es la cápsula, se encuentra prácticamente desaparecida, dando la impresión de que estas células quedan desnudas en el fijador empleado. Sólo se observa un fino material granular que creemos constituye el producto final de la reacción solubilizante de las membranas.

Negativo nº 12.103.

Aumento inicial 6.000.

Aumento final 20.400.

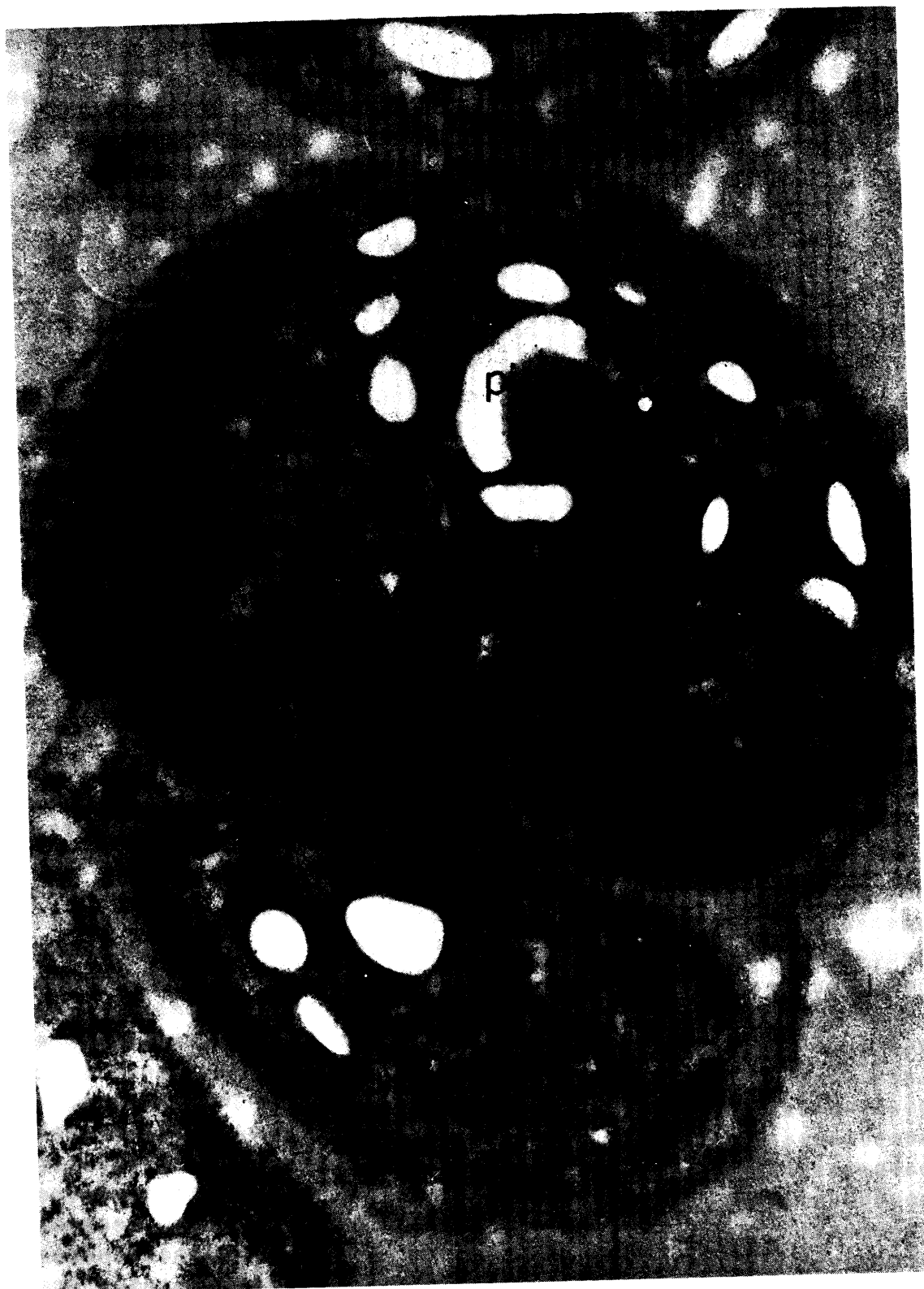


FOTOGRAFIA 11



FOTOGRAFIA 12

Fot. 12.- Fotografía electrónica de Chlamydomonas en fase de bipartición en la que se reconoce bien la zona que ocupa el cloroplasto, cuyas membranas se han solubilizado y que en el centro contiene el pirenoide y el resto del citoplasto rico en material granular de carácter predominantemente ribosómico, si se compara con las fotografías control. (Dobane)
Negativo nº 12.102.
Aumento inicial 6.000.
Aumento final 21.000.



FOTOGRAFIA 12

FOTOGRAFIA 13



Pot. 13.- Fotografía electrónica de una sección de Chlamydomonas tratadas con DS4499 (condensado del dodecil-alcohol, con 9,5 moles de óxido de etileno). El aspecto de la ultraestructura de estas células es completamente distinto del que ofrecen las tratadas con otros detergentes anteriormente descritos.

En primer lugar, no se ha producido una completa solubilización de la estructura de las membranas que en algunas zonas, incluso en la parte más céntrica, aparecen aún formando acúmulos de lamelas paralelas.

En segundo lugar, este detergente tiene un claro efecto vacuolizante que se manifiesta no por los espacios vacíos sin membrana que también observábamos en las células tratadas en otros detergentes, sino sobre todo en las vacuolas con membranas típicas y conteniendo material homogéneo de mediana densidad. Estas vacuolas, de material poco denso al paso de los electrones, son de distintos tamaños, algunos tan pequeños que semejan gotitas en las que progresivamente se van solubilizando los materiales que contienen.

Negativo nº 12.071.

Aumento inicial 6.000

Aumento final 30.000.



FOTOGRAFIA 13

FOTOGRAFIA 14

Fot. 14,- Fotografía electrónica a mayor aumento de parte de una Chlamydomona tratada con DS, en la que se observan periféricamente, numerosas vacuolas de material poco denso reconociéndose la zona de citoplasma ocupada por el cloroplasto, con su disposición reticular y en la que aún quedan algunas membranas sin solubilizar.

Negativo nº 12.067.

Aumento inicial 6.000.

Aumento final 21.000.



FOTOGRAFIA 14

FOTOGRAFIA 15

Fot. 15.- Fotografía electrónica de una sección de Chlamydomonas tratada con el detergente SDS (sodium-dodecil-sulfato). Constituye este grupo de resultados las modificaciones ultraestructurales menos interesantes que hemos observado bajo el tratamiento de detergentes. En efecto, en la figura 15 pueden observarse gran número de membranas con la típica disposición en lamelas paralelas, que únicamente en algunas zonas, casi siempre entre grupos vecinos, se difuminan o lo que es lo mismo sólo en parte se solubilizan, semejando zonas más homogéneas. Otros organoides como el núcleo, ribosomas, etc, no aparecen modificados. La cápsula no se visualiza, quedando, por tanto, el citoplasma prácticamente desprotegido.

Negativo nº 11.428.

Aumento inicial 6.000.

Aumento final 25.200.



FOTOGRAFIA 15

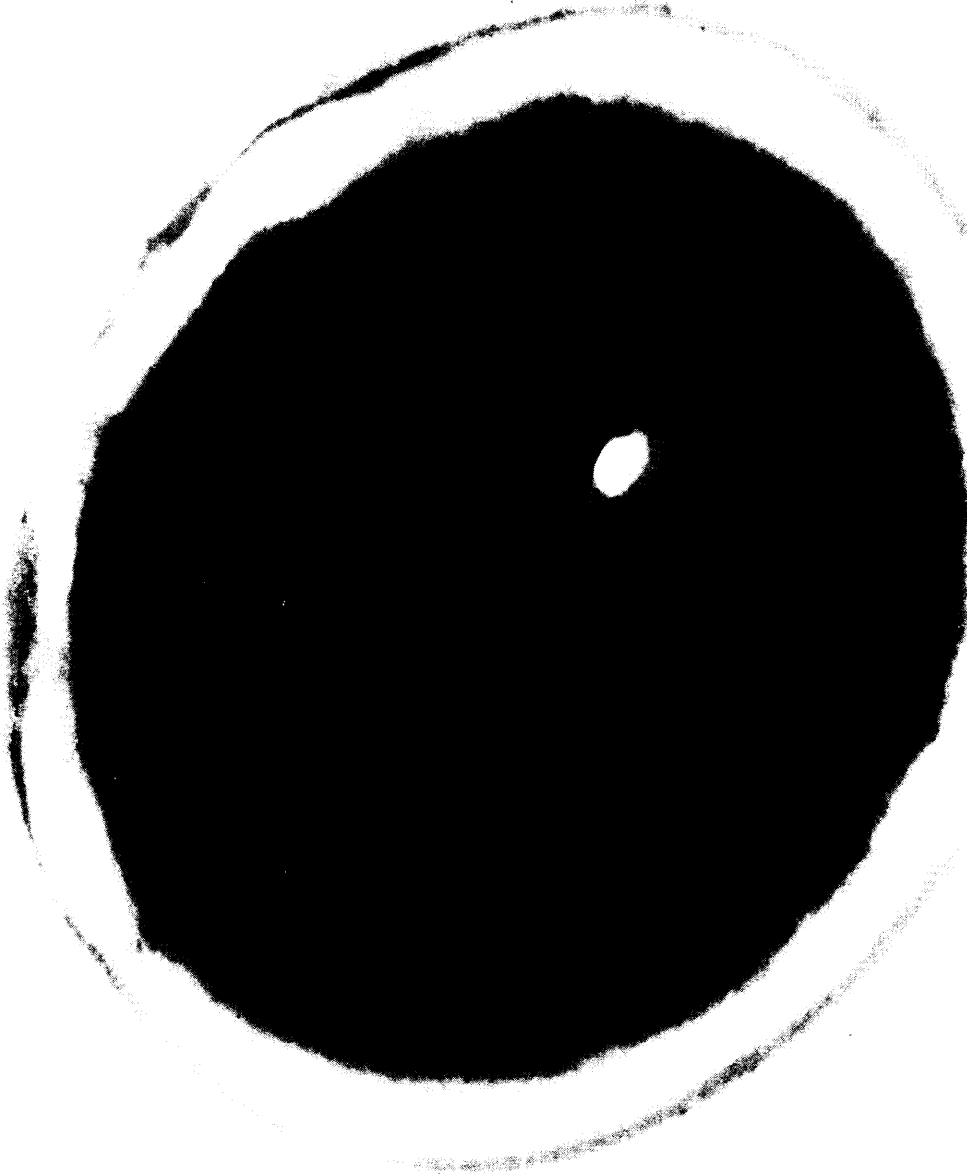
FOTOGRAFIA 16

Fot. 16.- Fotografía electrónica de una sección de Chlamydomonas oblonga tratadas con el detergente Lissapol SNXP (condensado de nonilfenol con 9,5 moles de óxido de etileno). La ultraestructura de las Chlamydomonas se encuentra aún más modificada que en las tratadas por Fenopón. Obsérvese como a más de la desaparición casi completa del material de la cápsula, en la interior se ha producido una casi completa homogenización del material membranoso, que forma la mayor parte de la superficie cortada y más hacia el centro, formando un anillo de gruesa pared, aparece el material de reserva también homogenizado y de densidad superior al de la pared.

Negativo nº 12.105.

Aumento inicial 18.000.

Aumento final 72.000.



FOTOGRAFIA 16

FOTOGRAFIA 17

Fot. 17.- Fotografía electrónica de una sección de Chlamydomonas oblonga tratadas con el herbicida Diquat (1,1'-dimetil, 2,2' dibromido dipiridilo).

Las modificaciones ultraestructurales más importantes observables, se relacionan de modo más intenso con la matriz citoplasmática que propiamente con el cloroplasto que aunque en algunas fotografías, como después veremos, se encuentra alterado, en contraste con los detergentes, no son propiamente las membranas del cloroplasto los sitios preferentes de localización de la actividad del herbicida.

Obsérvese que sólo se visualizan estructuras residuales de procesos de tipo lítico; esto es, no existen ni ribosomas ni organización de membranas de ningún tipo, prácticamente sin acúmulos de material de reserva. Se reconoce muy bien el cloroplasto con el pirenoide en situación central y que a diferencia con los resultados obtenidos por los tratamientos de detergentes, se observan en el mismo varias zonas en consonancia con sus distintos componentes bioquímicos.

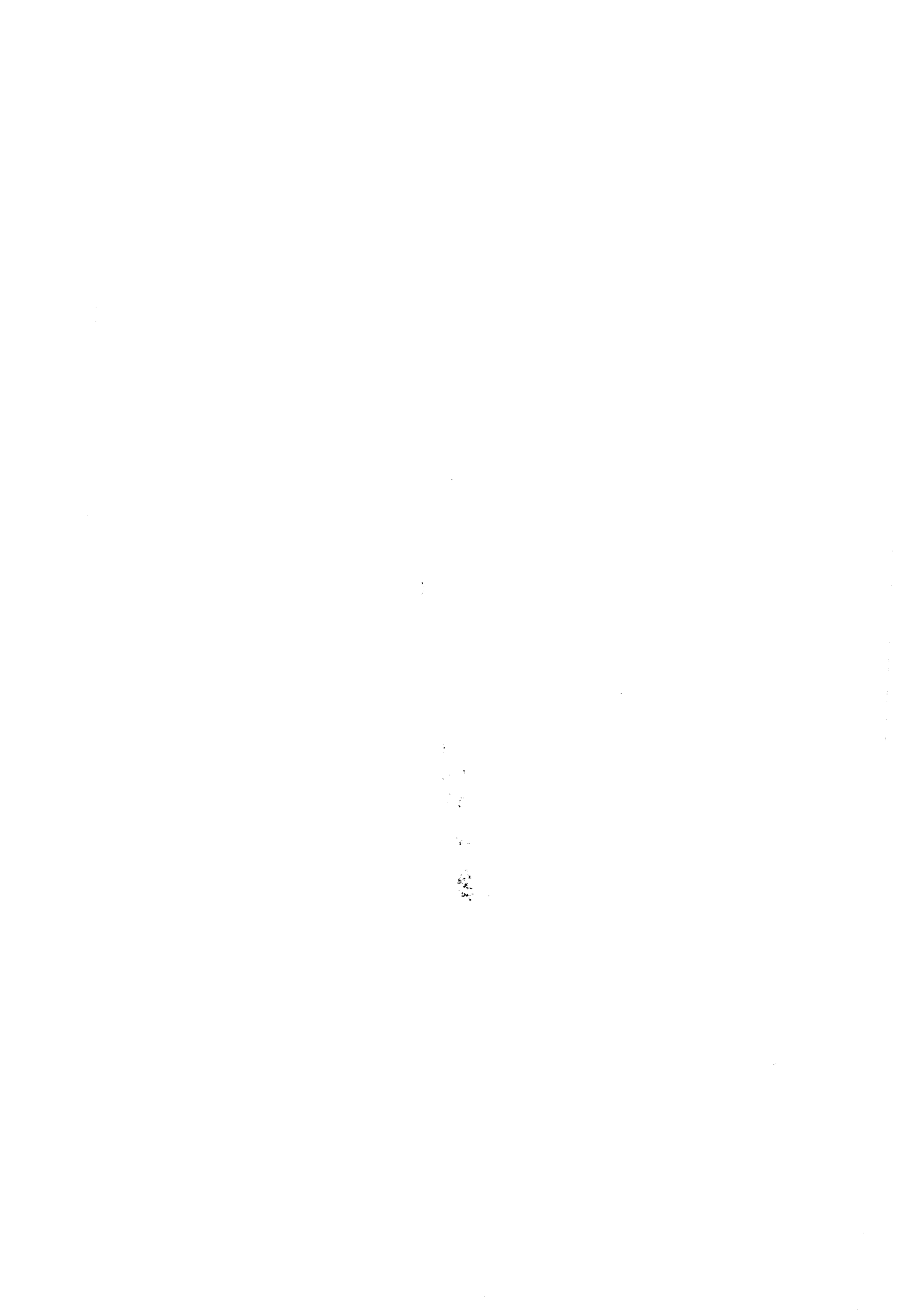
Negativo n° 11.052.

Aumento inicial 6.000.

Aumento final 24.000.



FOTOGRAFIA 17



FOTOGRAFIA 18

Fot. 18.- Fotografía electrónica de una sección de Chlamydomonas. Lo más interesante de esta fotografía es la buena visualización de la estructura de las membranas que forman las lamelas del cloroplasto. En efecto, puede muy bien seguirse las líneas que constituyen la estructura de la membrana con las inflexiones que éstas experimentan, para constituir perfectos fondos de saco, a los que se les puede aplicar en sentido peyorativo, el nombre de tilacoides, en los que en algún caso se observa algún material acumulado en su interior. Creemos que la razón de la perfecta visualización de estas membranas se debe a que, como veníamos estudiando en la fotografía 17, los herbicidas no actúan intensamente sobre las membranas debido, muy probablemente, a que destruyen u homogenizan el material que se dispone en las citadas membranas, con lo cual aumenta el contraste y osmofilia de éstas. En el pirenoide puede también notarse la casi perfecta visualización de algunas de las membranas que lo unían o continúan uniendo al resto del cloroplasto.

Negativo n° 11.181.

Aumento inicial 18.000.

Aumento final 63.000.



FOTOGRAFIA 18

FOTOGRAFIA 19

Fot. 19.- Fotografía electrónica de una sección de Chlamydomonas tratada con el herbicida Paraquat (1,1"-dimetil-4,4'-cación dipiridilo). La observación rápida y esquemática de los resultados obtenidos con el Diquat y los que corresponden al Paraquat, muestran en principio, una gran similitud, hecho que está en consonancia con el gran parecido en cuanto a la composición química de ambos herbicidas (sales de bupiridilo).

En esta figura es llamativo el gran espacio vacío existente en torno al pirenoide, que sugiere algún efecto tensoactivo sobre sus materiales de reserva.

Las lamelas del cloroplasto están en gran parte bien conservadas y en el citoplasma el material granular aparece poco modificado, habiéndose producido vacuolas con material osmiófilo de desecho en su interior.

Negativo nº 11.557.

Aumento inicial 6.000.

Aumento final 28.200.



FOTOGRAFIA 19

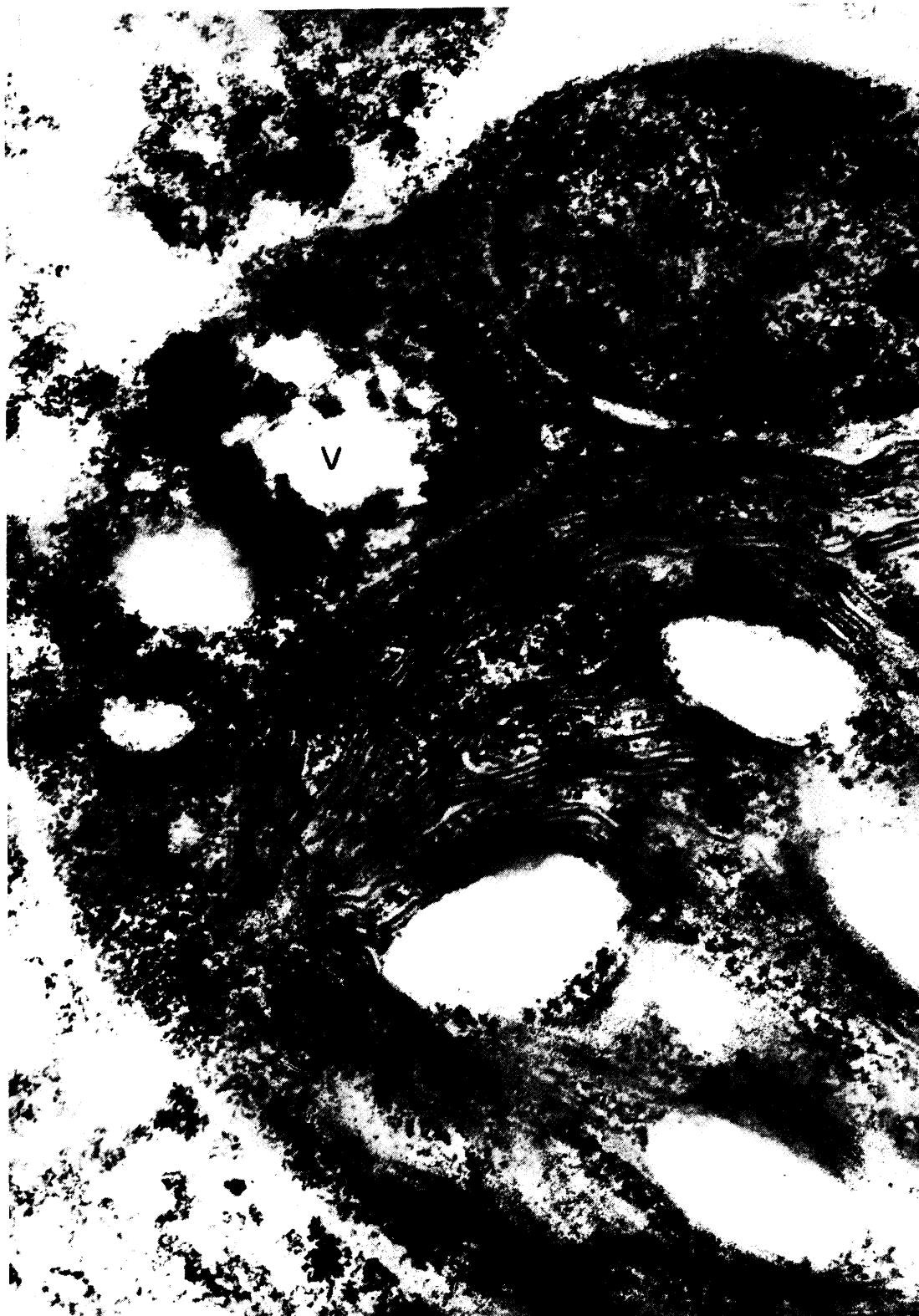
FOTOGRAFIA 20

Fot. 20.- Fotografía electrónica de una sección de Chlamydomonas tratada con Paracuat, en la que al igual que observamos en la fotografía anterior, se visualizan muy bien las membranas que agrupadas forman las típicas lamelas. En la parte superior, se observa asimismo el núcleo, muy bien conservado con espacio perinuclear visible, aunque sus correspondientes membranas estén poco conservadas. Resulta curiosa la resistencia de las membranas del cloroplasto a la acción del medio químico empleado, en contraste con la casi desaparición de las demás membranas citoplasmáticas que se observan en la figura 20. Entre las lamelas y en el citoplasma se aprecian múltiples granos, en gran parte ribosómicos, de estructura casi normal. También, junto al núcleo, se observa una zona vacuolizada que muestra en su interior material osmiófilo de proteínas características de desecho.

Negativo n° 11.559.

Aumento inicial 18.000.

Aumento final 63.000.



FOTOGRAFIA 20

FOTOGRAFIA 21

Fot. 21.- Fotografía electrónica de una sección de Chlamydomonas tratada por el herbicida Trioxone (2,4,5-Triclorofenoxiacético).

En primer lugar, se observa la buena conservación de las cápsulas similares a la normal estructura observada en las fotografías de control. En el interior, el cloroplasto aparece modificado en su normal disposición porque entre los acúmulos de membranas se han producido unas zonas de vacuolización, conteniendo un material semiduro en su interior, que progresivamente van creciendo y rechazando por hinchamiento a las estructuras membranosas. Este hecho se observa aún mejor en la fotografía anterior en las que estas zonas de vacuolización están progresivamente más desarrolladas.

En la figura 21 debemos distinguir las alteraciones por vacuolización que produce el Trioxone, de los espacios vacíos, propios del cloroplasto, que observábamos bien en las fotografías del control y que constituyen un carácter normal de la disposición reticulada de sus lamelas. Estas áreas vacías del retículo de las lamelas son numerosas mientras que en la fotografía anterior son menos numerosas y extensas que el de las vacuolas. Destacamos, además, como detalle morfológico interesante, el que estas vacuolas, de material poco denso, tienen diferenciada una membrana mediante la cual se relacionan con el resto de las estructuras membranosas del cloroplasto.

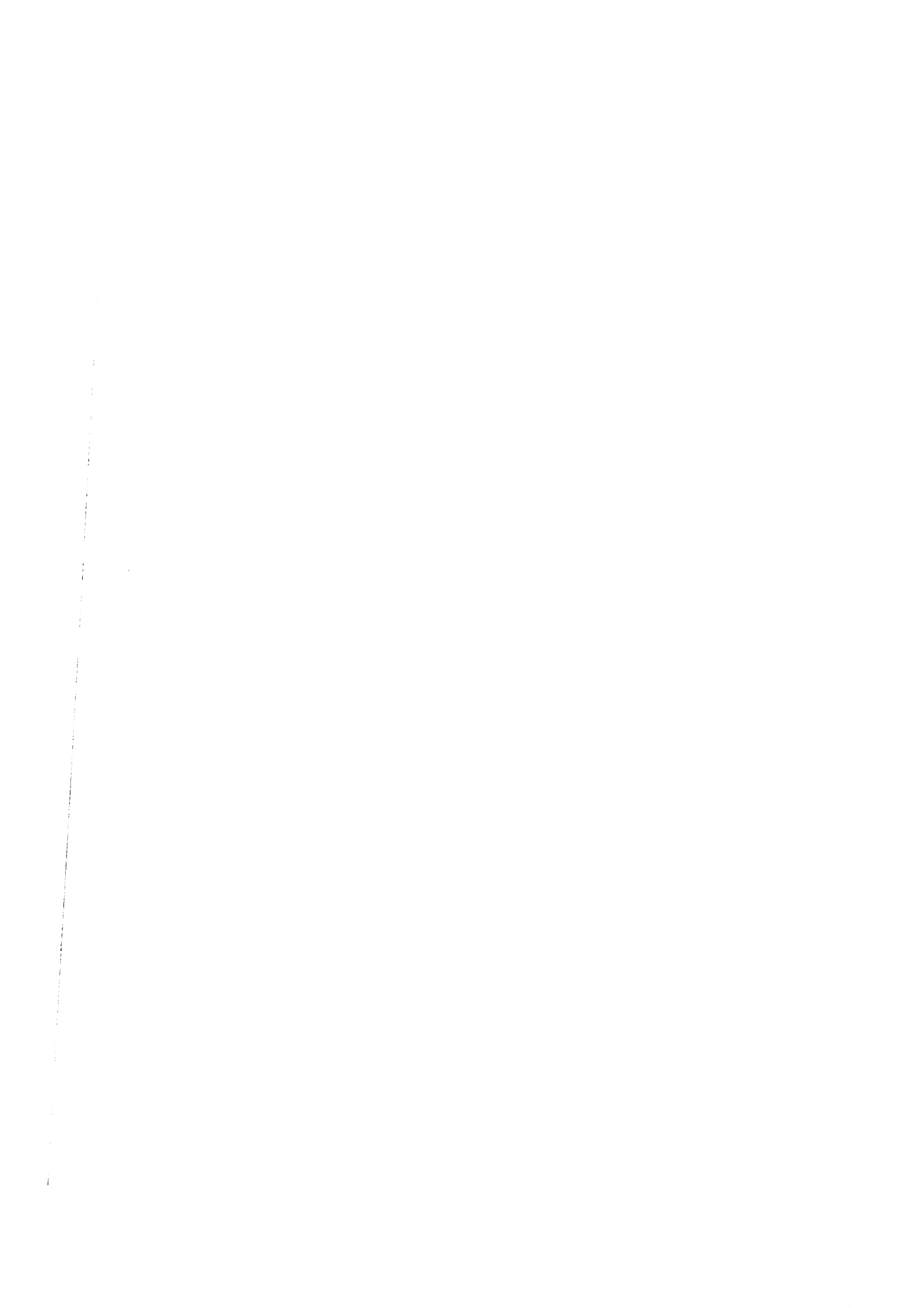
Negativo nº 11.567.

Aumento inicial 6.000.

Aumento final 25.200.



FOTOGRAFIA 21



FOTOGRAFIA 22

Fot. 22.- Fotografía electrónica en la que se hace un estudio comparativo con respecto a la figura anterior. Observamos que en la fotografía 21 se visualiza muy bien el pirenoide y la extensa área de retracción que lo circunda, mientras que en ésta toda la superficie del corte está ocupada por el cloroplasto y el citoplasma circundante muy modificado.

La cápsula se continúa observando muy bien, por lo que creemos que está poco modificada.

Negativo n° 11.568.

Aumento inicial 18.000.

Aumento final 72.000.



FOTOGRAFIA 22

FOTOGRAFIA 23

Fot. 23.- Fotografía electrónica de una sección de Chlamydomonas tratada por el herbicida Hyvarx (5 bromo-3-sec-butil-, 6-metil-uracil), que actúa como veneno celular produciendo grandes destrucciones de la célula, tanto a nivel del cloroplasto como sobre la matriz citoplasmática.

Puede reconocerse muy bien que, más que la alteración de las membranas, el efecto producido es la densificación del material interlamelar, apareciendo densamente teñido. En el núcleo la cromatina está desdibujada debido a su alteración.

Negativo nº 11.864.

Aumento inicial 18.000.

Aumento final 72.000.



FOTOGRAFIA 23

FOTOGRAFIA 24

Fot. 24.- Fotografía electrónica de una sección de Chlamydomonas en la que se observa un detalle de las lamelas del cloroplasto todavía visibles. Así mismo a la izquierda de la célula aparece una zona marginal del citoplasma no alterada. La cápsula, aunque disminuida en grosor, está aún presente. Hay una gran área redondeada de la que parten lamelas y en cuyo centro destaca un gran acúmulo de material osmiófilo, quizá material de destrucción, provocado por la substancia empleada.

Negativo nº 11.865.

Aumento inicial 18.000.

Aumento final 72.000.



FOTOGRAFIA 24

FOTOGRAFIA 25

Fot. 25.- Fotografía electrónica de una sección de Chlamydomonas tratadas con el herbicida Lorox: -3-(3,4-diclorofenil)-1-metoxi-1-metilurea. Este herbicida que actúa sobre la segunda fase del ciclo lumínico de la fotosíntesis, produce sobre la matriz citoplasmática de estos protozoos una considerable alteración, mientras que las membranas del cloroplasto se conservan casi íntegramente. Sólo en algunas zonas, como la correspondiente al polo inferior de esta figura, presentan algunas membranas destruidas. El pirenoide está bien conservado, aunque el espacio claro situado a su alrededor aparece en parte ocupado por las sustancias de la matriz citoplasmática destruida. En el polo superior se observa bien el núcleo que muestra dos áreas vacías, posiblemente correspondientes al nucleolo, que ha sido destruido en su componente ribonucleico; esto es, aparece una imagen como de negativo del nucleolo.

Negativo nº 11.890.

Aumento inicial 6.000.

Aumento final 22.200.



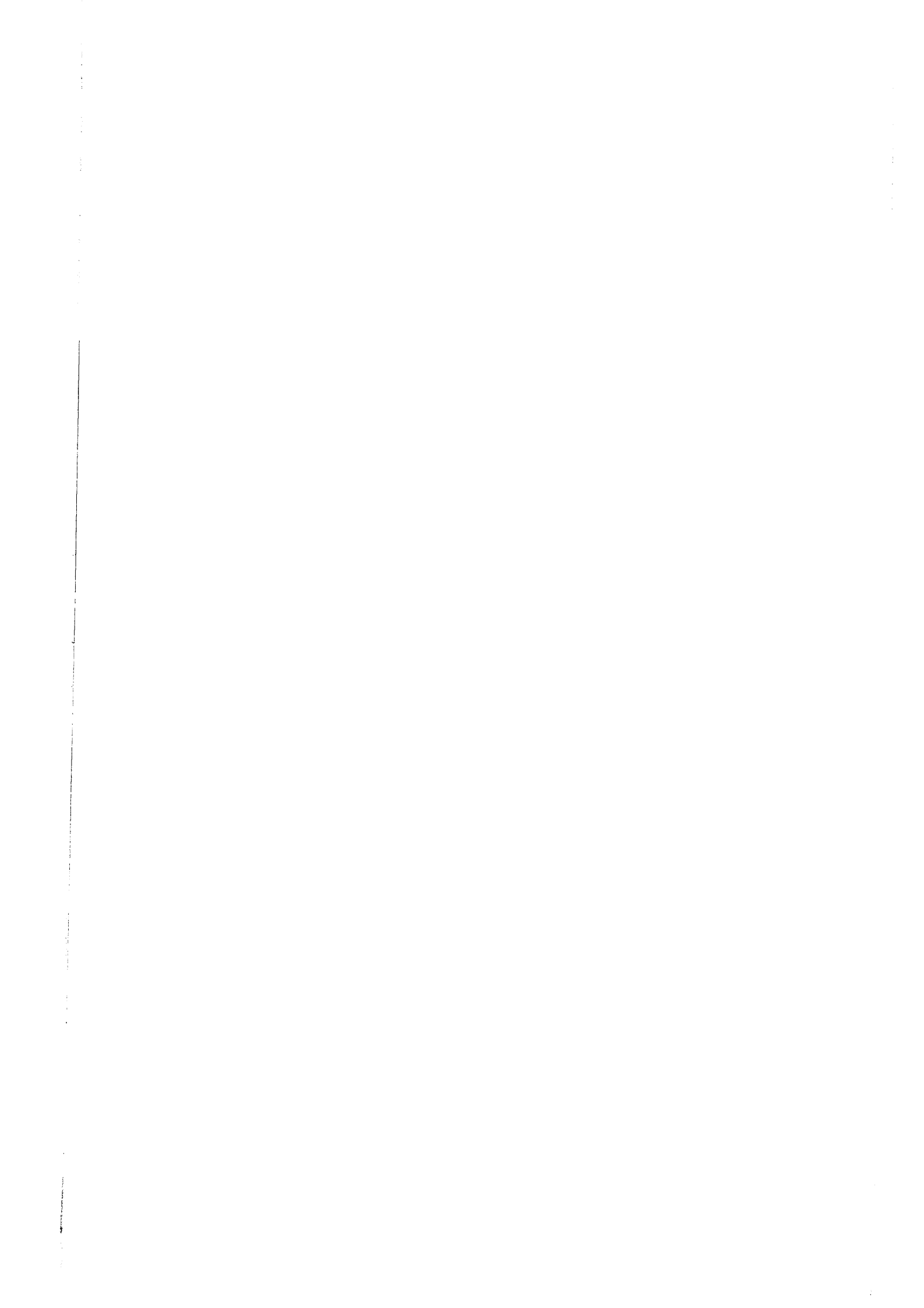
FOTOGRAFIA 25

FOTOGRAFIA 26

Fot. 26.- Fotografía electrónica a gran aumento de una zona de Chlamydomonas en la que observamos grupos de membranas paralelas que en un extremo se encurvan y confluyen radialmente en una zona pequeña redonda de material lipóideo. En el resto, la matriz citoplasmática se muestra muy alterada.
Negativo nº 11.884.
Aumento inicial 18.000.
Aumento final 72.000.



FOTOGRAFIA 26



FOTOGRAFIA 27

Fot. 27.- Fotografía electrónica de una sección de Chlamydomonas tratada por el herbicida Karmex = 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea. El efecto de este herbicida produce una destrucción mucho más intensa en la célula, tanto a nivel citoplasmático, como sobre el sistema de membranas del cloroplasto. Esta destrucción se acompaña de una vacuolización con formación de material homogéneo de mediana densidad, en el que parecen flotar los restos del material destruido probablemente no solubles en el mismo. Salvo la cápsula que aparece medianamente conservada en el interior de estas Chlamydomonas, no se reconoce estructura alguna que recuerde el patrón normal. Incluso por las intensas modificaciones de la estructura normal de estas células provocadas por el Karmex, la consistencia física se modifica presentando gran resistencia al hacer secciones por el ultramicrotomo. Asimismo difícilmente se observan células completas.

Negativo nº 11.891.
Aumento inicial 6.000.
Aumento final 26.400.



FOTOGRAFIA 27

FOTOGRAFIA 28

Fot. 28.- Fotograffa electrónica de distintas secciones de Chlamydomonas tratadas por el herbicida Karmex que ratifican lo expuesto en la descripción de la fotografía 27.

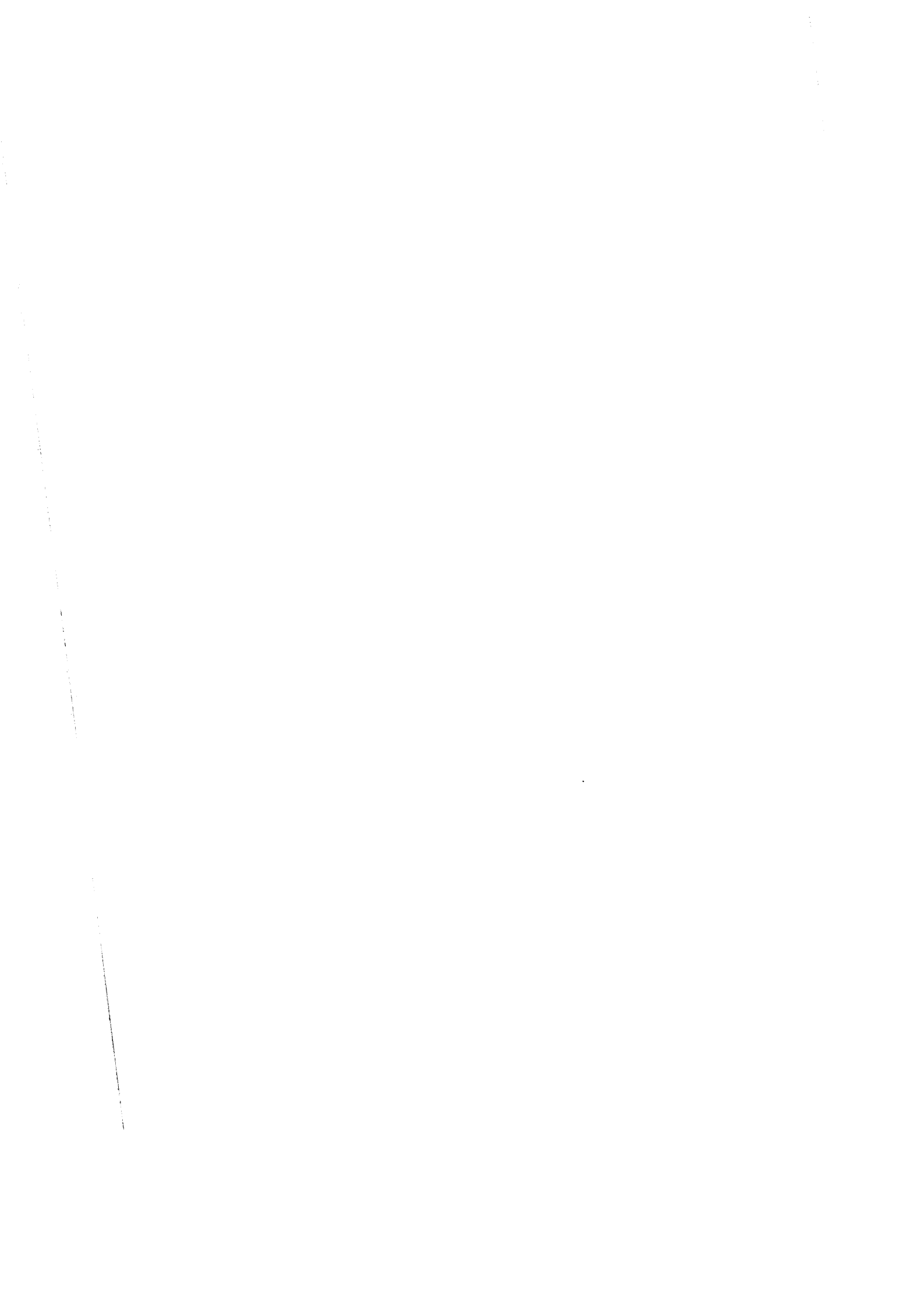
Negativo nº 11.892.

Aumento inicial 6.000.

Aumento final 26.400.



FOTOGRAFIA 28



FOTOGRAFIA 29

Fot. 29.- Fotografía electrónica de una sección de Chlamydomonas tratadas con el herbicida Simazina = -2-cloro-4,6-bis (etilamino)-s-triazina. Las alteraciones que provoca esta sustancia se localizan tanto en el cloroplasto como en la matriz citoplasmática. En el cloroplasto, alguno de los campos de la estructura de las membranas que forman las lamelas, se encuentran, al menos, parcialmente destruidos, continuidad de la estructura de las líneas medianamente densas que los forman. Este es un aspecto ultraestructural que consideramos típico de la acción de este herbicida.

La matriz interlamelar aparece en este caso también modificada, en el sentido de que no muestra apenas campo granular. El citoplasma marginal situado por fuera del cloroplasto aparece modificado menos intensamente que las membranas.

Negativo nº 11.981.

Aumento inicial 72 mA.

Aumento final x 3,7.



FOTOGRAFIA 29

FOTOGRAFIA 30

Fot. 30.- Fotografía electrónica de otra sección de Chlamydomonas, tratadas con el mismo antibiológico que las anteriores, en la que la destrucción y homogenización de la membrana de cloroplasto es más intensa que en los casos anteriores, pero teniendo una intensa densidad probablemente fundamentada en su osmiofilia. En el citoplasma se observan también dos vacuolas de caracteres parecidos a los de la figura 29. Asimismo se aprecian algunas zonas de citoplasma con material granular sólo medianamente modificado.

Negativo nº 11.974.
Aumento inicial 62 mA.
Aumento final x 4,3.



FOTOGRAFIA 30

FOTOGRAFIA 31

Fot. 31.- Fotografía electrónica de una sección de Chlamydomonas, tratadas con el herbicida Atrazina =(-2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamina-s-trizaina).

El efecto de estas sustancias se manifiesta con respecto al citoplasma en una intensa solubilización de las membranas, más intensa en lo que respecta a las nucleares y por la producción de zonas de solubilización de sustancias, tipo vacuolas, aunque sin membrana, que cuando están situadas cerca de la periferia rompen su pared, vaciando su contenido hacia el exterior.

Negativo n° 11.961.

Aumento inicial 6.000.

Aumento final 27.000.



FOTOGRAFIA 31

FOTOGRAFIA 32

Fot. 32.- Fotografía electrónica a mayores aumentos de parte de una Chlamydomona tratada con Atrazina, al objeto de observar la ultraestructura del pirenoide y su íntima relación con las membranas del cloroplasto vecino.

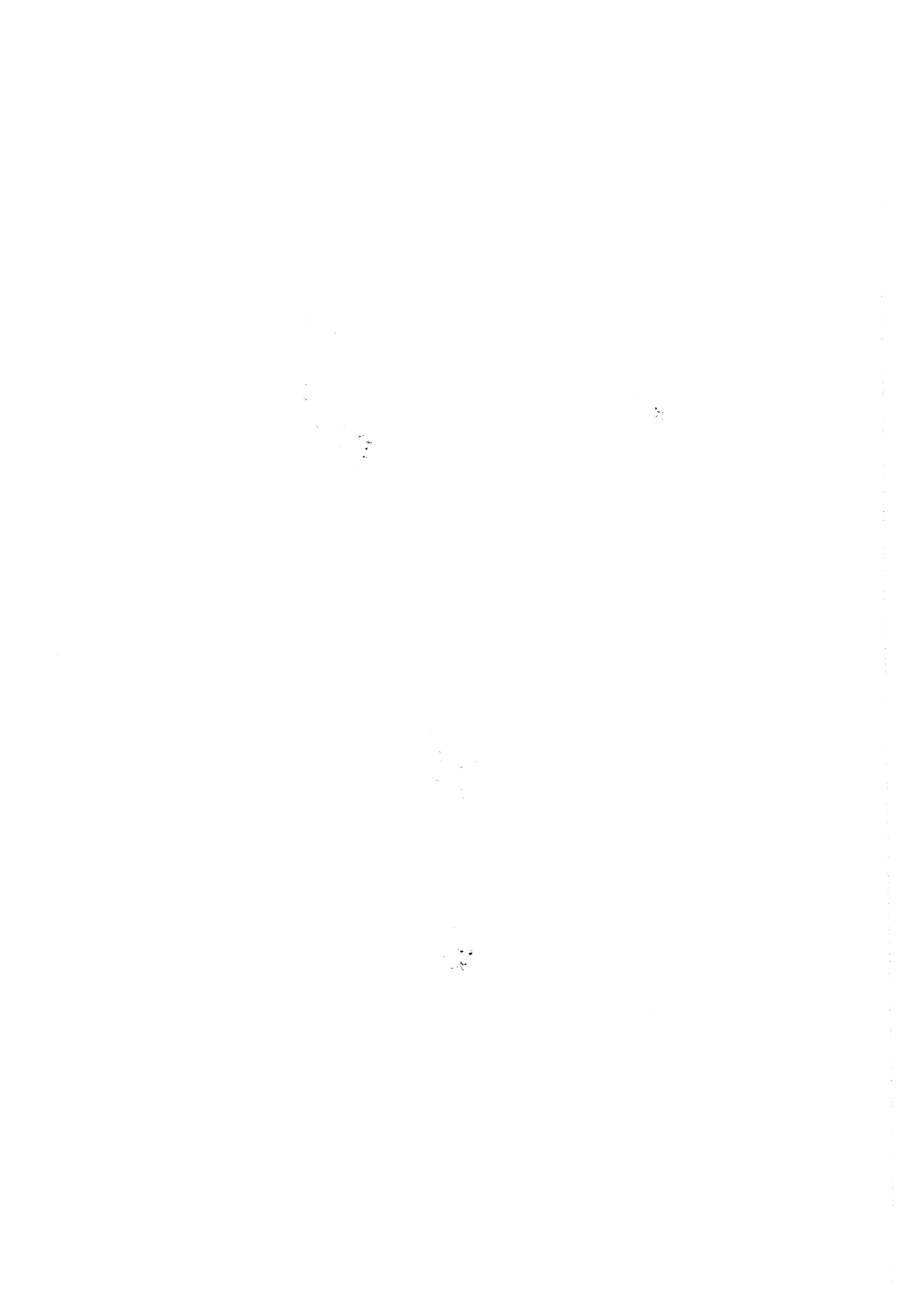
Negativo nº 11.972.

Aumento inicial 18.000.

Aumento final 95.400.



FOTOGRAFIA 32



V.5. COMPROBACION FUNCIONAL DE LAS MODIFICACIONES ULTRAESTRUCTURALES ENCONTRADAS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA.

En los estudios realizados sobre la ultraestructura de Chlamydomonas oblonga, hemos visto la acusada acción de los herbicidas y detergentes elegidos sobre los distintos componentes celulares, especialmente sobre los sistemas de membranas (nuclear, celular, lamelar) y matriz citoplasmática. Por otro lado, en el capítulo V.2, se reseñan los resultados obtenidos por espectrofotometría en relación con la acción de estos antibiológicos sobre los pigmentos detectados en los controles.

Muchos herbicidas modernos actúan como fotocompetidores, inhibiendo la fotosíntesis y provocando la muerte por clorosis.

La acción de los herbicidas biperidílicos "Diquat" y "Paraquat", (descubiertos en los Laboratorios de Jealott's Hill, 1950-59), se debe a que actúan como radicales libres disueltos en el agua, los cuales interfieren el metabolismo de los seres fotosintéticos, cuya muerte rápida es ocasionada por sustancias tóxicas producidas como reacción natural en la planta, DODGE (1970).

Ya en 1933, MICHAELIS y HILL, demostraron que la adición de un electrón a estas sales producía radicales libres estables e inestables, intensamente coloreados.

La rapidez de la fotoactividad herbicida del Paraquat despertó gran interés por su mecanismo de acción.

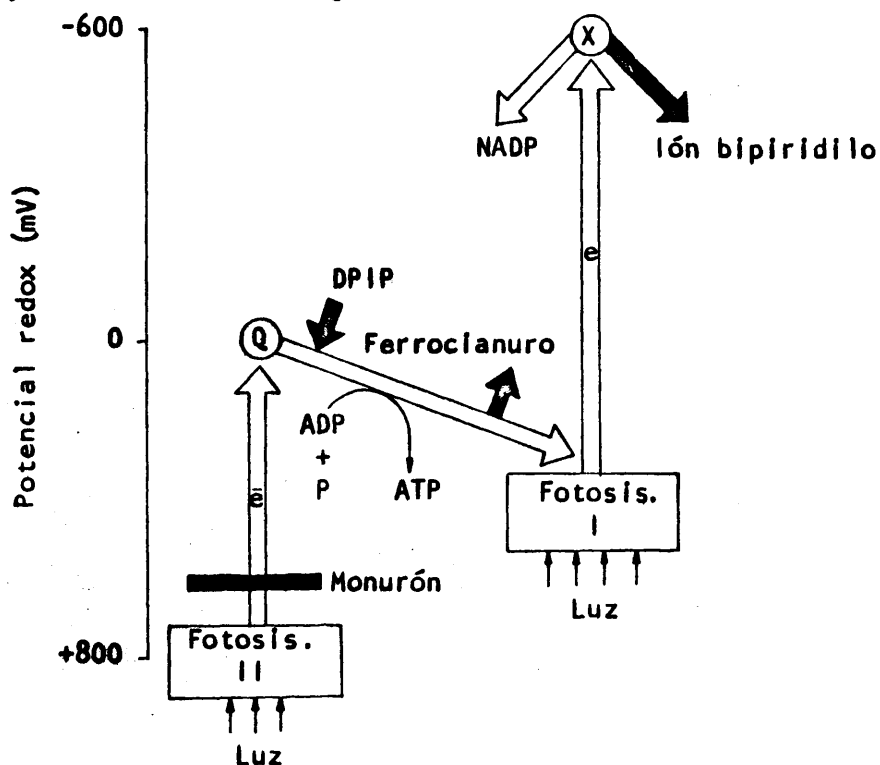
La acción herbicida de las sales cuaternarias de biperidilo es compleja. HOMER (1960) constata que en sí no son tóxicas, pero llegan a serlo por reducción de sus radicales libres. Este proceso envuelve la adición a la molécula de un electrón y la pérdida de una carga positiva. El electrón captado es libre de jugar una u otra posición y la facilidad de reducción del compuesto. está relacionada con el número de posiciones que dicho electrón pueda ocupar siendo máxima cuando los dos anillos están en el mismo plano y los dos electrones asociados libremente intercambiables.

La acción herbicida de estas sales por reducción a radicales libres dentro de la planta está ligada a los procesos fotosintéticos y respiratorios.

La aplicación de sales de Diquat y Paraquat produce la rápida muerte de un gran número de plantas expuestas a la luz. La destrucción también se produce, aunque más lentamente, en la oscuridad. La tensión del oxígeno juega un importante papel en la formación de radicales libres y tóxicos. Las últimas investigaciones parecen demostrar que dichas sales producen radicales libres del tipo peróxido, a partir del agua en presencia de oxígeno siendo los agentes tóxicos. La causa de la muerte de los seres con clorofila, tratados con esta sustancia, se debe a que estos radicales degradan las proteínas a otras macromoléculas en el protoplasma celular.

Cuando se inhibió la fotosíntesis por herbicidas derivados de la urea, MEES (1960) vio que la acción del Monurón retardaba considerablemente la rapidez con que el Diquat mata a las hierbas.

Es sabido que el Monurón inhibe la fotosíntesis al bloquear el flujo de los electrones, procedentes de la fotólisis del agua, hacia los cloroplastos, como se observa en el esquema, tomado del trabajo de DODGE (1970)

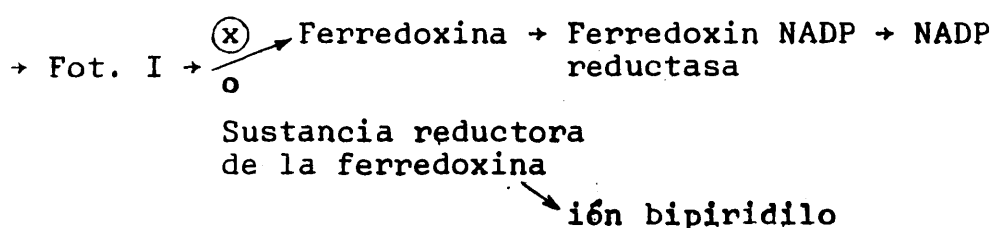


Según este autor, el modo de acción de los herbicidas a base de biperidilos Paraquat y Diquat, impidiendo la reducción del NADP a NADPH y la fosforilación del ADP a ATP, compuestos necesarios para la incorporación del CO₂. JAGENDORF y MARGULIES (1960) experimentalmente observaron con cloroplastos aislados que la reducción de NADP se inhibía progresivamente con el aumento de la concentración del herbicida, mientras que no había inhibición ni de la fosforilación fotosintética, ni de la reducción de ferrocianuro potásico, aceptor artificial de electrones, ZWEIG, SHAVIT y AVRON (1965). Esta última reducción resulta fuertemente inhibida por Monurón, precisamente en algún punto de la cadena de transporte de electrones, entre el aceptor primario de ellos en Fotosistema II (coen. Q) y el Fotosistema I. AVRON y BEN-HAYYIM (1969).

Iluminando en condiciones totalmente anaerobias, MITZUI, PANEQUE y ARNON (1963), demostraron la reducción del Paraquat por cloroplastos aislados. Para evitar el desprendimiento de oxígeno cuando se iluminan los cloroplastos, se puede sustituir el fotosistema II por un donador de electrones, como el DPIP (2,6-diclorofenol indofenol), mantenido en estado reducido por cisteína o ascorbato. La reducción cuantitativa del Paraquat se manifestaba por un incremento de la D.O. a 650 mμ, al irse acumulando el radical libre Paraquat. Al penetrar el aire en el tubo de reacción, tras un periodo de reducción, se produce reoxidación inmediata.

Estos experimentos sugieren que los herbicidas compitan por captar el flujo de electrones del aceptor primario del fotosistema I.

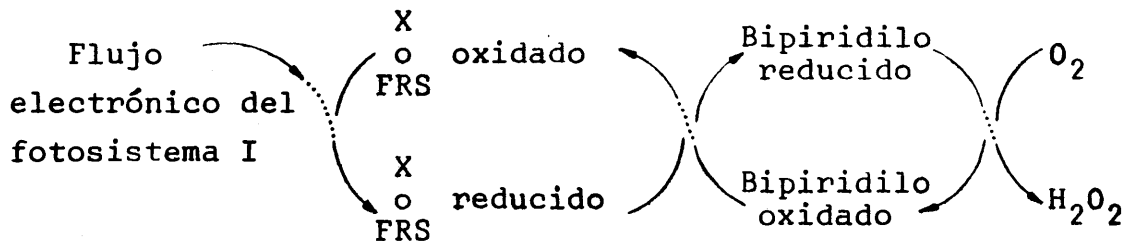
El proceso de interacción de los derivados de biperidilo con el transporte de electrones en los cloroplastos se puede resumir:



siendo "x" en la naturaleza una sustancia aislada por YOCUM y SAN PIETRO (1969).

MEES apuntó la importancia de la reoxidación instantánea de las sales bipyridilo, en la actividad herbicida al observar que la acción letal de estas sales sufría un considerable retardo cuando la materia vegetal tratada se iluminaba en atmósfera de nitrógeno. DAVENPORT (1963) mostró que el Diquat sufría una reoxidación instantánea y producía peróxido de hidrógeno.

Esto sugiere que las dosis catalíticas de herbicidas piridílicos, presentes en el cloroplasto, sufren una reducción y una oxidación rápidas, que representaremos por el esquema:



El papel primario de un herbicida, como demuestran los experimentos realizados en remolacha azucarera, por PARK (1964) y en cotiledones de lino, por HARRIS y DODGE con Paraquat, se manifiesta por un declinar casi inmediato en la absorción fotosintética del CO₂ y una inactivación completa a las 5 horas de iluminación, lo que concuerda con una interferencia directa de la reducción del NADP en los cloroplastos. Si el peróxido de hidrógeno se produce dentro del cloroplasto como resultado de la oxidación del bipyridilo, se deberá a la cantidad de catalasa suficiente para causar su rápida descomposición y detoxicación. Gran parte de la actividad de la catalasa de los vegetales está localizada en los peroxisomas y glicoxisomas extracloroplásticos.

HEATH y PACKER (1968) encontraron una peroxidasa cíclica fotoinducida en cloroplastos aislados de espinacas, observando no sólo la decoloración de la clorofila y agotamiento del O₂, sino también la formación del aldehído malónico, resultante de la descomposición de los hidroperóxidos de los

ácidos grasos tri-insaturados. Una reacción en cadena iniciada por los radicales libres, sería la causa de la ruptura de los ácidos grasos no saturados en los cloroplastos y membranas celulares, llevándolos gradualmente a su destrucción y a la formación del dialdehído malónico. El fenómeno es quizá similar al producido por el envejecimiento natural de los seres con clorofila.

Los derivados de la urea ejercen su acción herbicida al influir sobre los procesos fotosintéticos de las plantas. WESSELS y VAN DER VEEN (1956) afirman que estos compuestos inhiben la fase lumínica de la fotosíntesis.

COOKE (1956) demostró que una suspensión de cloroplastos de hojas de espinaca (10^{-6} M) de Monurón inhibían totalmente la fotólisis de los cloroplastos en el agua, calculándose que una molécula de dicho herbicida inhibía la actividad fotosintética de 125 moléculas de clorofila.

MINSHALL (1960) apunta una disminución en la producción de carbohidratos y sugiere que en ello reside la acción tóxica de estos compuestos, ya que privan a la planta de alimentos y energía. DUYSSENS (1961) estudia la acción herbicida de Diurón y postula que dos de los sistemas pigmentarios están implicados en la oxidación de citocromos. Así la luz a 650 m μ oxida los citocromos, mientras que a 550 m μ los reduce. Se vio, sin embargo, que 10^{-6} moles de Diurón lo inhibían a 560 m μ y en su lugar, se producía una reacción de oxidación. PREVOST (1958) demostró que el Monurón penetra en las mitocondrias hinchándolas y retorciéndolas.

Las Triazinas estudiadas por EXER (1958) y MORELAND (1959) influyen en la actividad fotoquímica de los cloroplastos inhibiendo la reacción de HILL. También, aunque con menos valor, se observó la alteración de los procesos mitóticos. RUDENBERG (1955) observó como decrecía el número de células mostrando una metafase, anafase y telofase normales, en semillas de Vicia faba, la cual absorbe los herbicidas por la raíz, actuando en ella como esterilizantes.

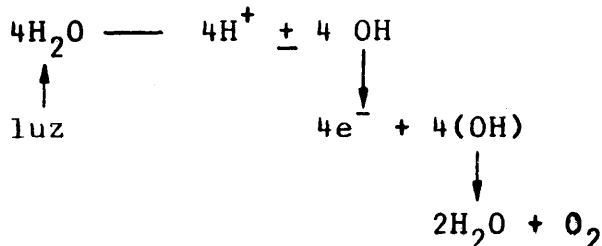
Basándonos en los precedentes datos bibliográficos, en

los aportados por VERNON y ZAUGG (1960), para caracterizar la reacción de HILL mediante el ascorbato-DPIP, que fotorreduce el NADP, y en los trabajos de GORMAN y LEVINE (1965) en un mutante de Chlamydomonas, capaz de reducir el NADP con ascorbato-DPIP, que actúa entre el citocromo f y el Fotosistema I, hemos usado esta sal "DPIP" como aceptor de protones y electrones originados en la fotólisis del agua.

Si el DPIP no es reducido (teniendo en cuenta que actúa en el fotosistema II), es decir, no restablece la cadena vectora de electrones, es porque ha habido interferencia en la fotólisis del agua.

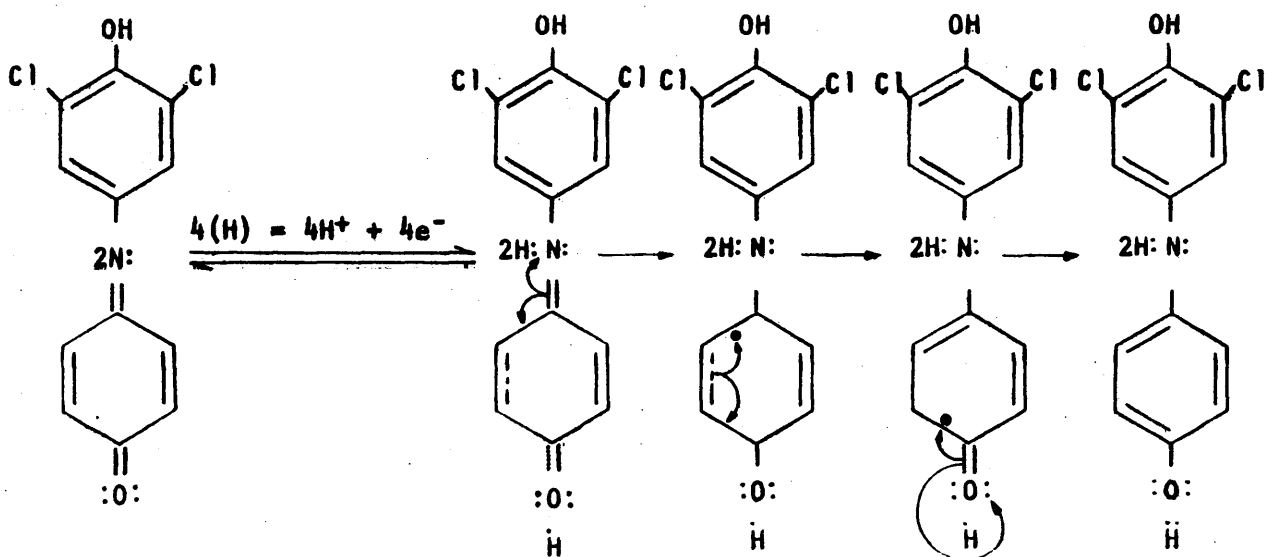
El proceso para restablecer dicha corriente de electrones, lo expresamos esquemáticamente como sigue:

1º) Fotólisis del agua



Los cuatro electrones irán a reducir al DPIP en el Fotosistema II, restableciendo la cadena de electrones, como a continuación se indica:

2º)



Utilizando DPIIP como donador de electrones según nuestros métodos observamos una marcada inhibición de la reacción de HILL, por los antibiológicos empleados, según se expresa en las siguientes gráficas.

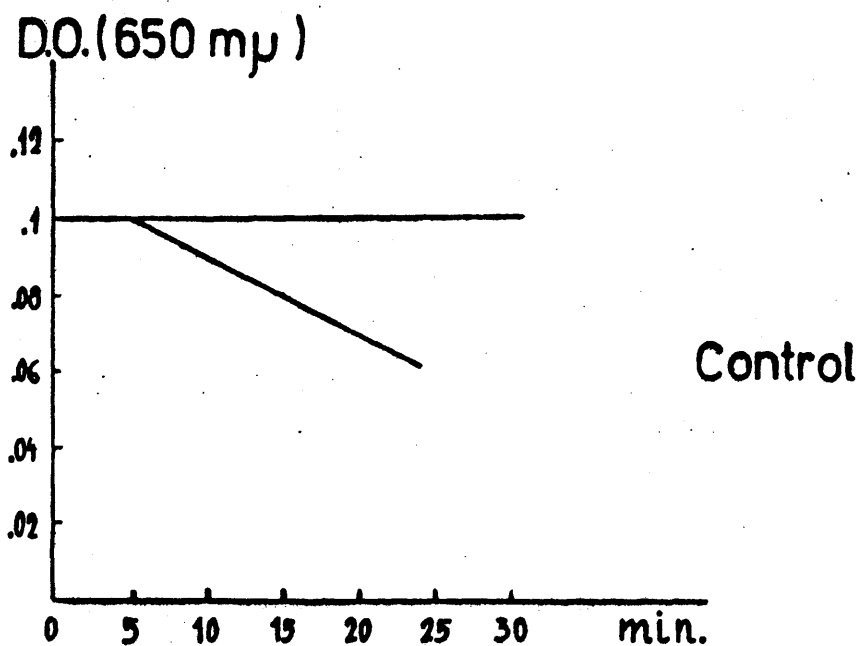


Fig. 25.- Comprobación de la reacción de HILL en medio control conteniendo Chlamydomonas oblonga, utilizando el DPIP como aceptor de H^+ y e^- .

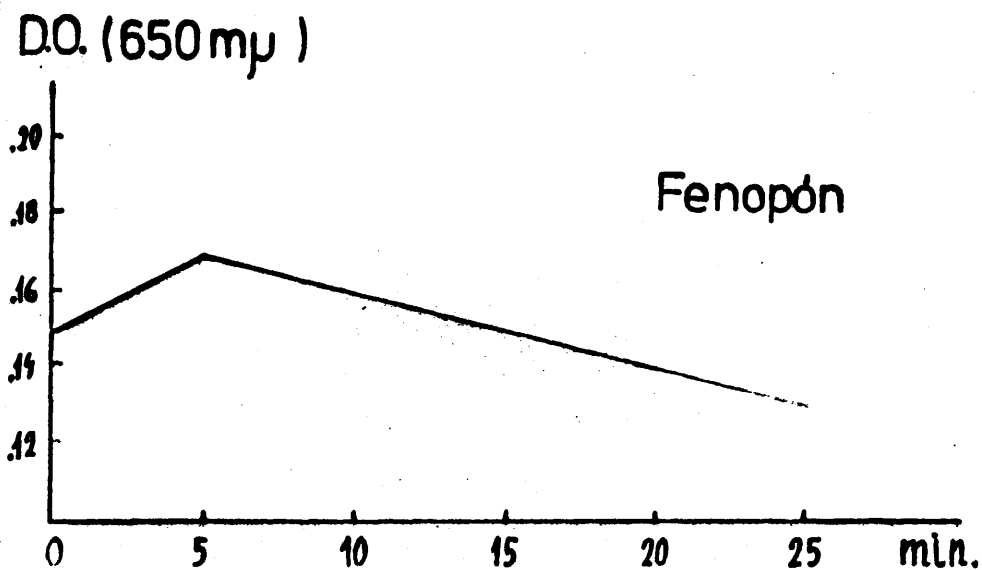


Fig. 26.- Comprobación de la reacción de HILL en medio con Fenopón, conteniendo Chlamydomonas oblonga, utilizando el DPIP como aceptor de H^+ y e^- .

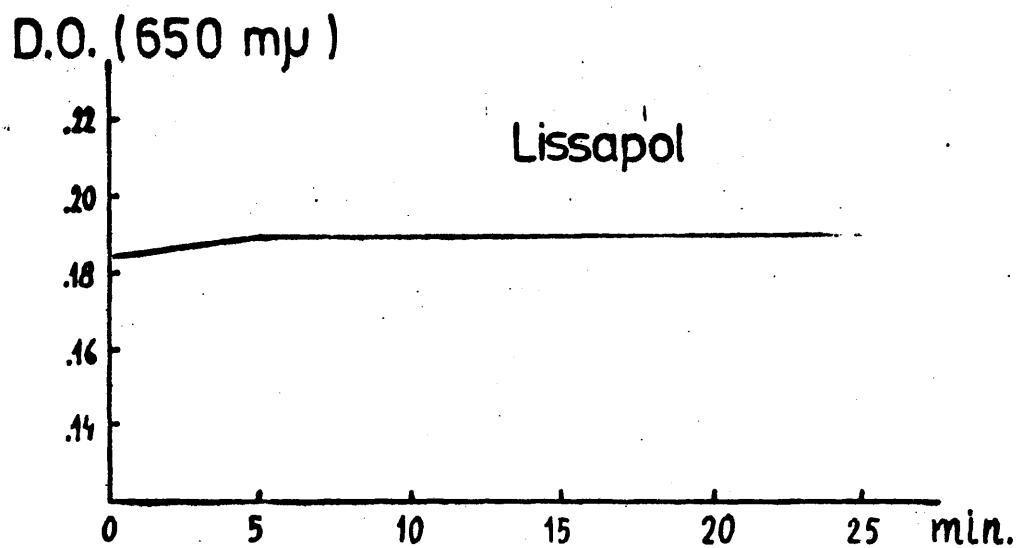


Fig. 27.- Comprobación de la reacción de HILL en medio con Lissapol, conteniendo Chlamydomonas oblonga, utilizando el DPIP como aceptor de H^+ y e^- .

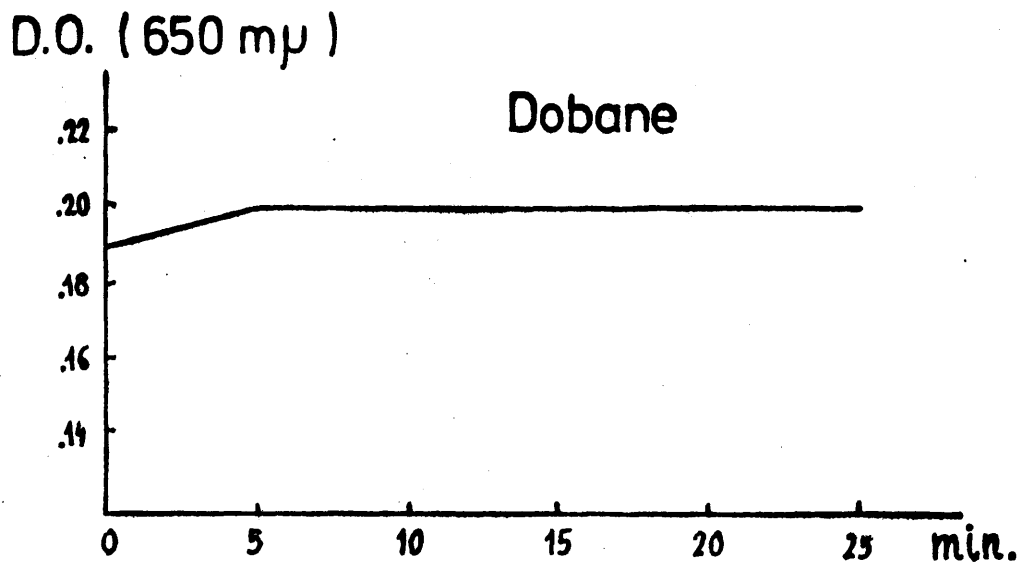


Fig. 28.- Comprobación de la reacción de HILL en medio con Dobane, conteniendo Chlamydomonas oblonga, utilizando el DPIP como aceptor de H^+ y e^- .

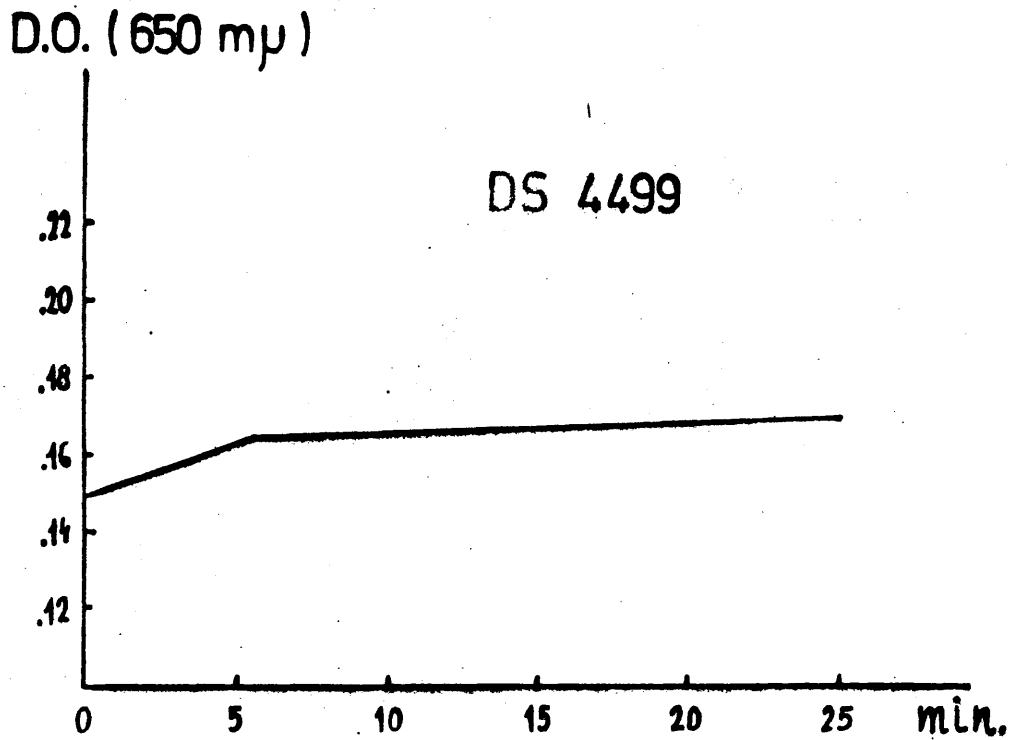


Fig. 29.- Comprobación de la reacción de HILL en medio con DS 4499, conteniendo Chlamydomonas oblonga, utilizando el DPIP como aceptor de H^+ y e^- .

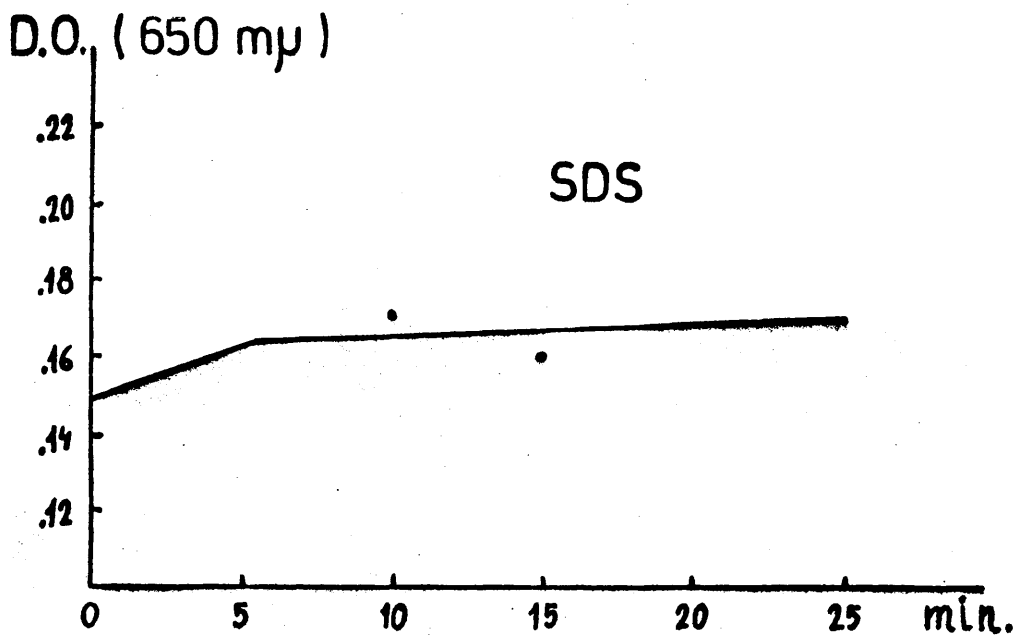


Fig. 30.- Comprobación de la reacción de HILL en medio con SDS, conteniendo Chlamydomonas oblonga, utilizando el DPIP como aceptor de H^+ y e^- .

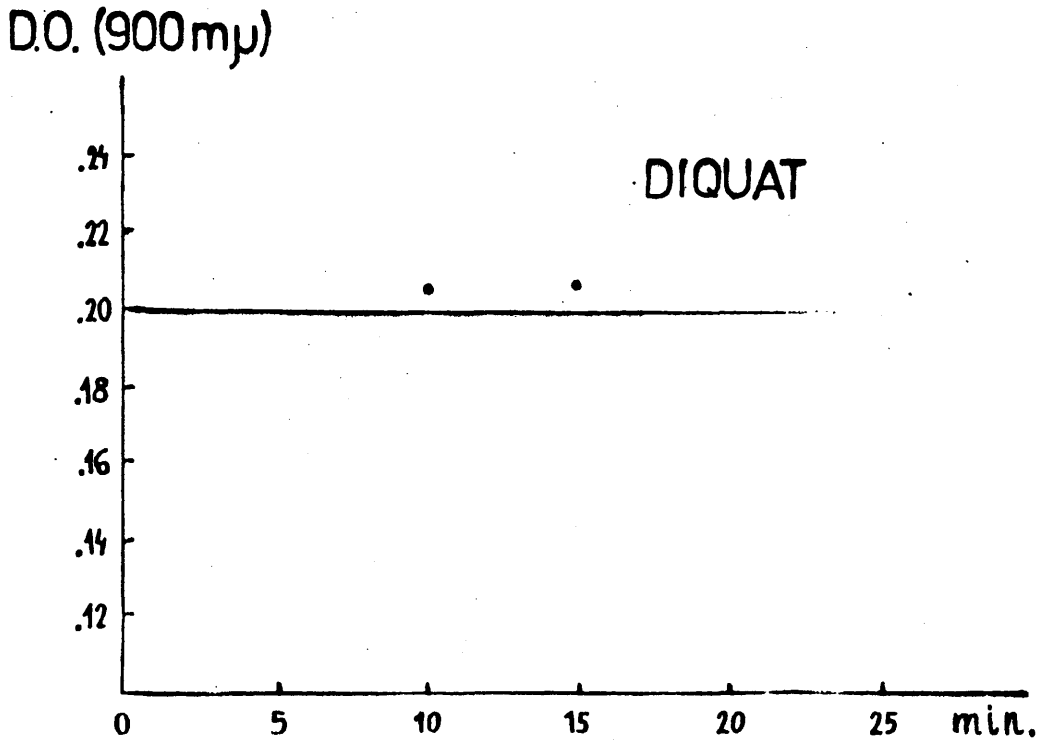


Fig. 31.- Comprobación de la reacción de HILL en medio con Diquat, conteniendo Chlamydomonas oblonga, utilizando el DPIP como aceptor de H^+ y e^- .

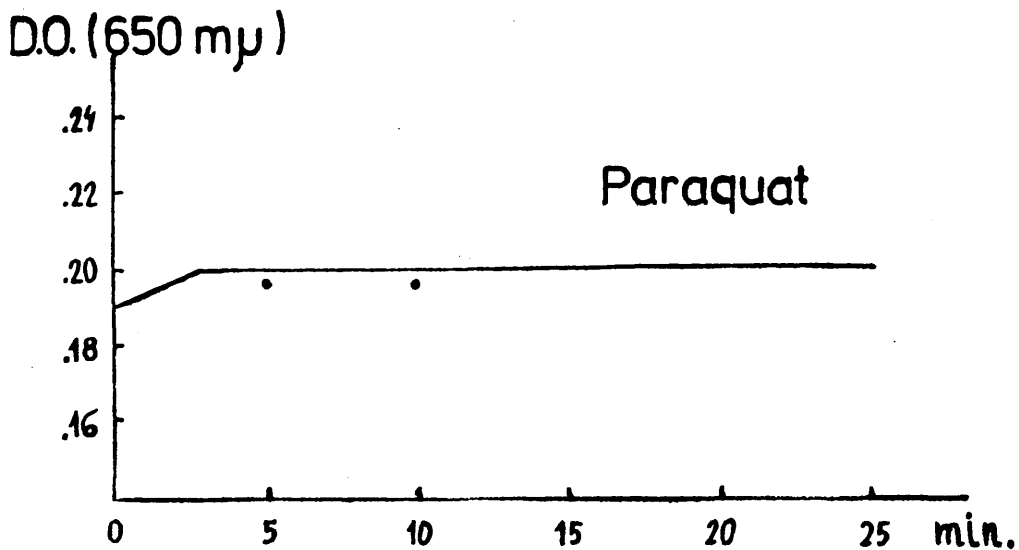


Fig. 32.- Comprobación de la reacción de HILL en medio con Paraquat, conteniendo Chlamydomonas oblonga, utilizando el DPIP como aceptor de H^+ y e^- .

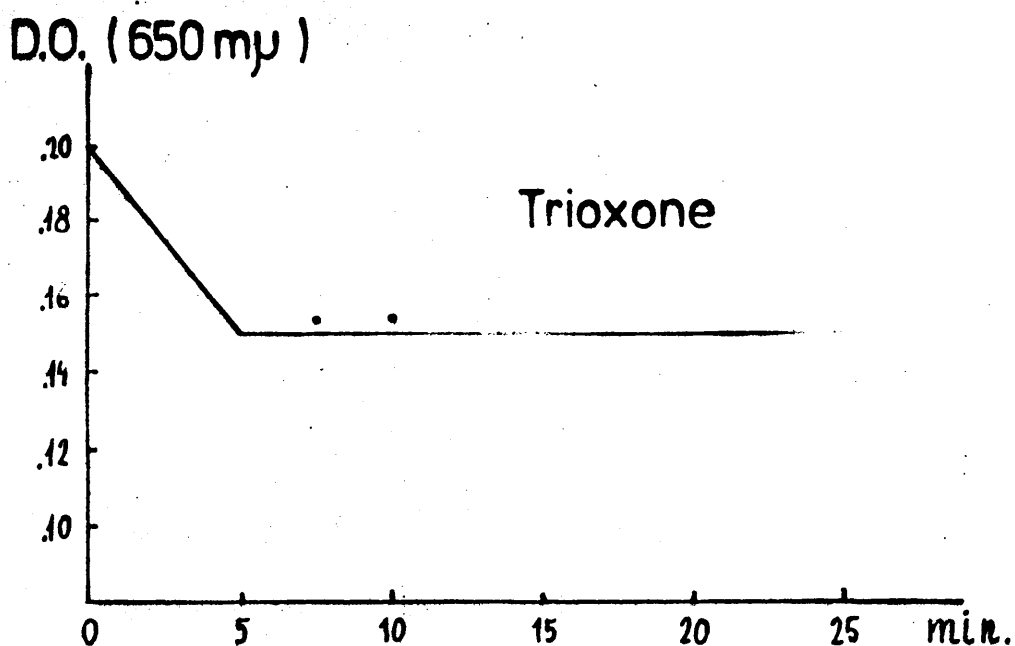


Fig. 33.- Comprobación de la reacción de HILL en medio con Trioxone, conteniendo Chlamydomonas oblonga, utilizando el DPIP como aceptor de H^+ y e^- .

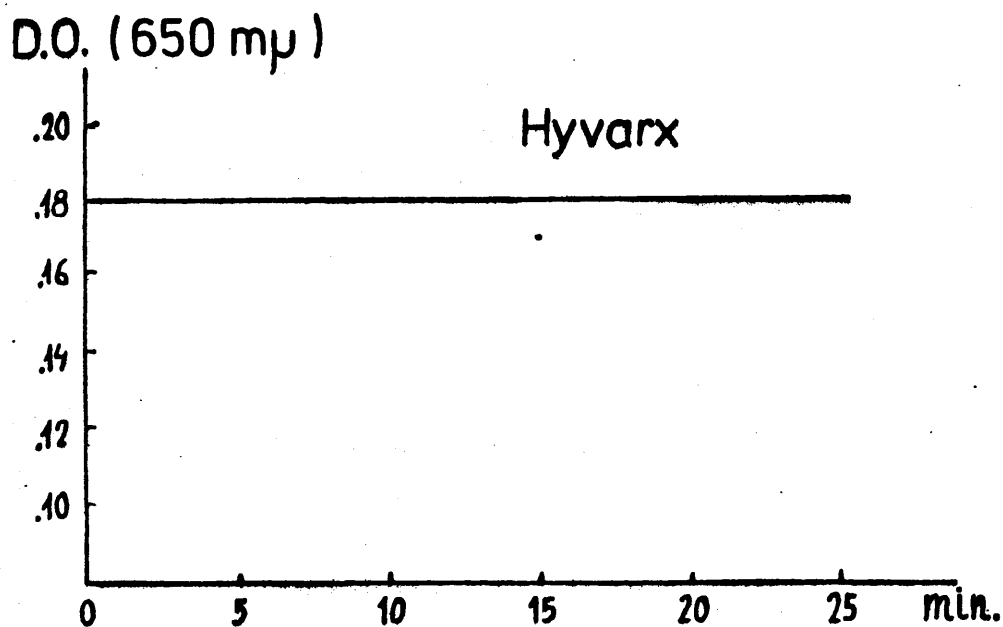


Fig. 34.- Comprobación de la reacción de HILL en medio con Hyvarx, conteniendo Chlamydomonas oblonga, utilizando el DPIP como aceptor de H^+ y e^- .

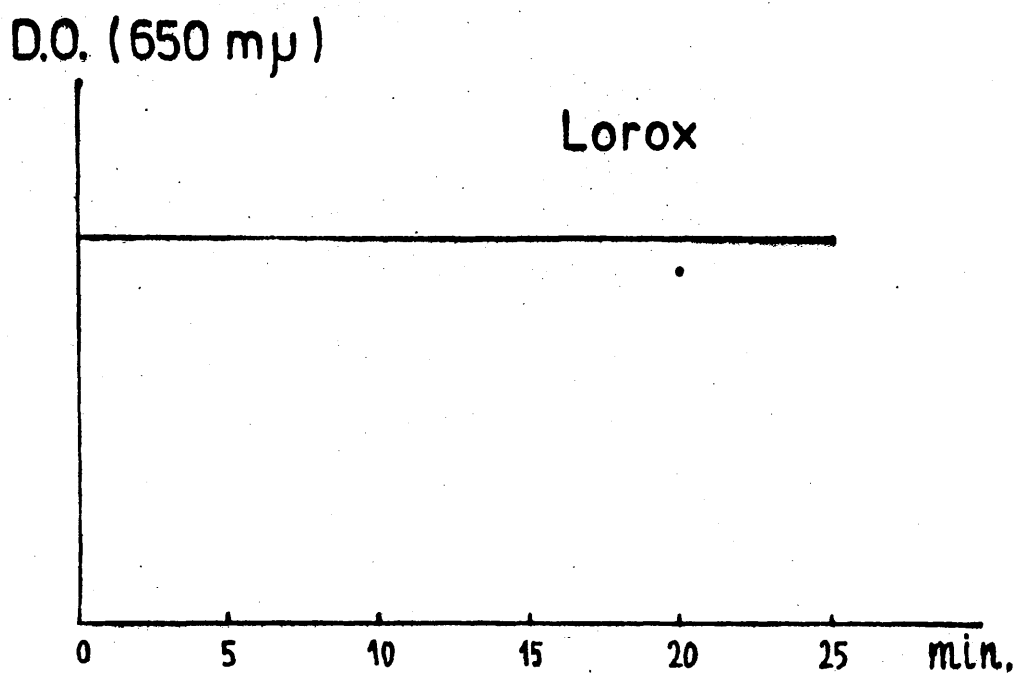


Fig. 35.- Comprobación de la reacción de HILL en medio con Lorox, conteniendo Chlamydomonas oblonga, utilizando el DPIP como aceptor de H^+ y e^- .

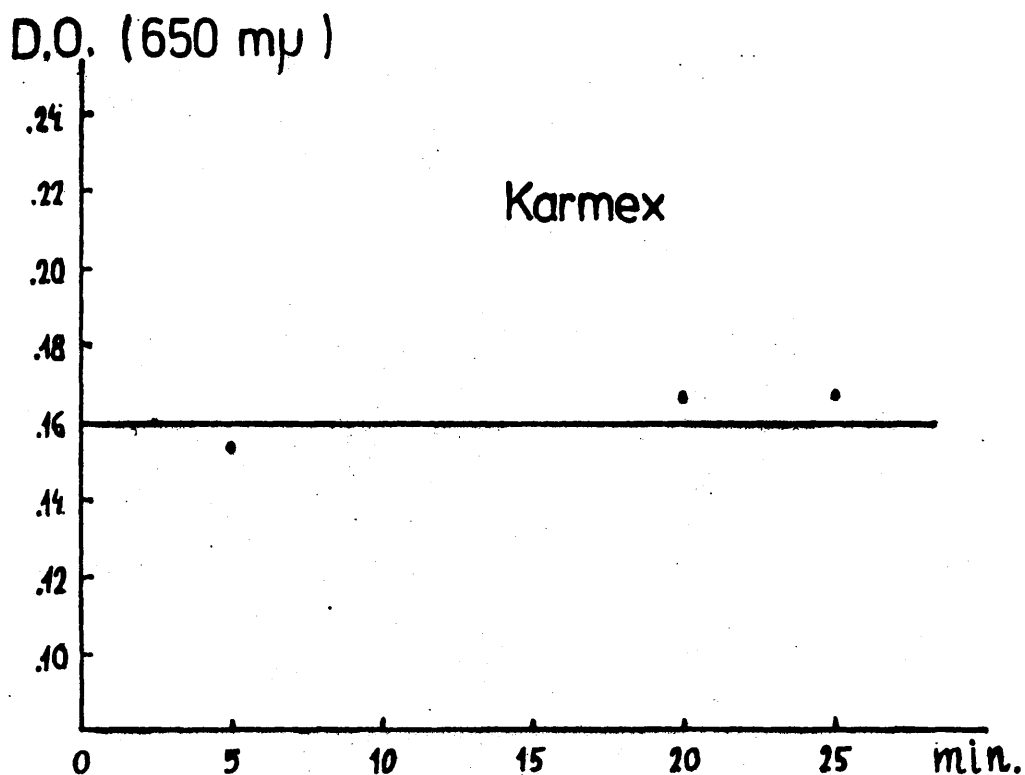


Fig. 36.- Comprobación de la reacción de HILL en medio con Karmex, conteniendo Chlamydomonas oblonga, utilizando el DPIP como aceptor de H^+ y e^- .

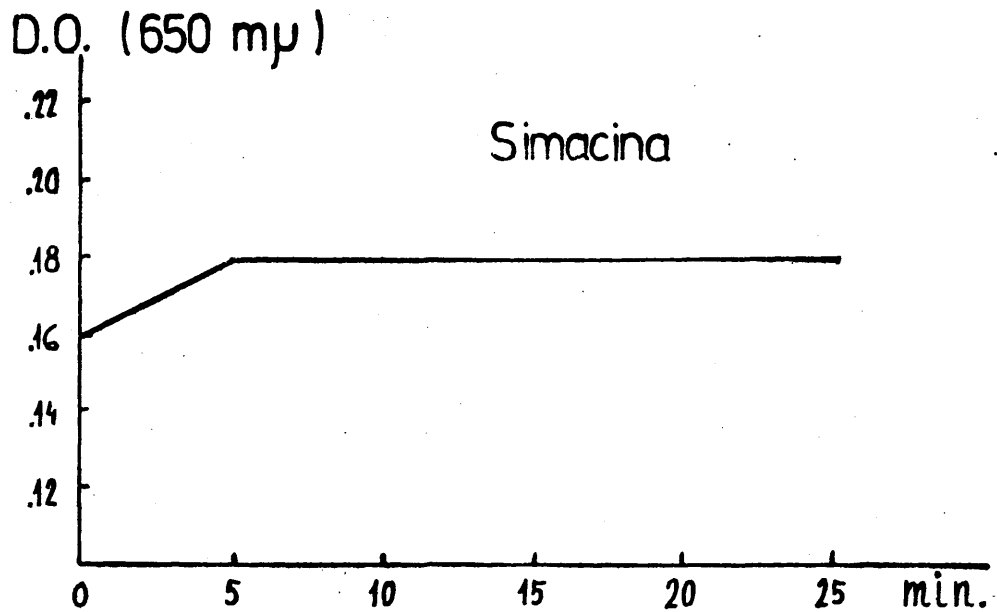


Fig. 37.- Comprobación de la reacción de HILL en medio con Simacina, conteniendo Chlamydomonas oblonga, utilizando el DPIP como aceptor de H^+ y e^- .

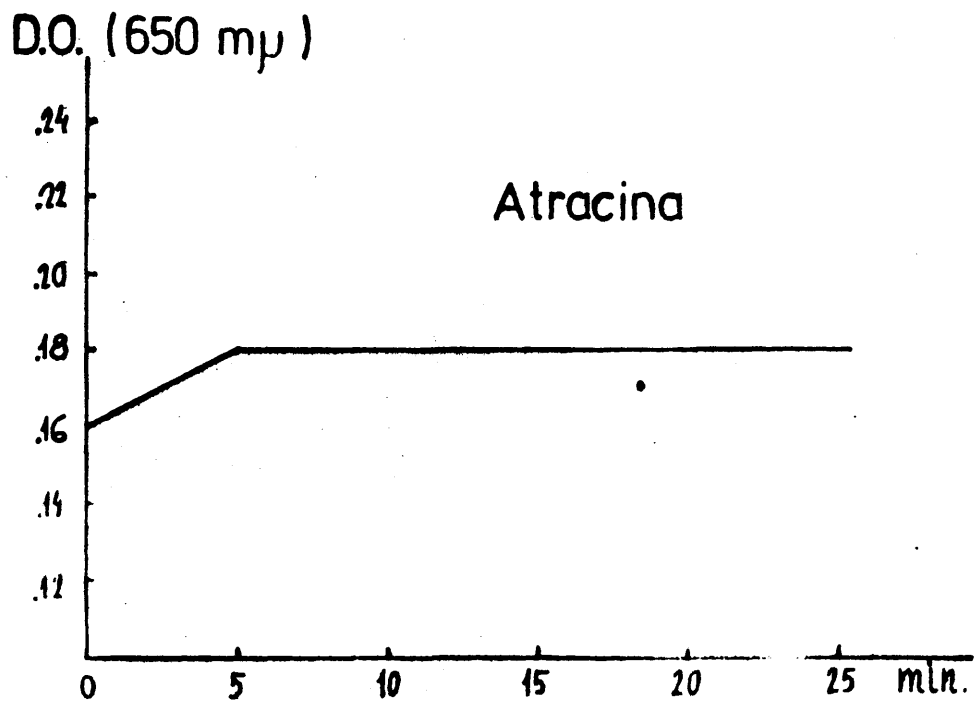


Fig. 38.- Comprobación de la reacción de HILL en medio con Atracina, conteniendo Chlamydomonas oblonga, utilizando el DPIP como aceptor de H^+ y e^- .

VI. CONCLUSIONES

1.- En el estudio de los controles del Protozoo, Chlamydomonas oblonga, hemos encontrado los siguientes resultados:

a) Crecimiento.- Las condiciones óptimas para alcanzar la curva logarítmica, venciendo la prolongada latencia inicial, se lograron con el medio Proteosa-Peptona, pH 6,5, 28°C e iluminación constante. De este modo encontramos crecimiento a las 24 horas, alcanzando su máximo a los 11 días de cultivo.

b) Pigmentos.- Los pigmentos encontrados por cromatografía en capa fina, siguiendo el método de STAHC y BURT, que da directamente el pigmento correspondiente a cada Rf y por el método de HOLDER, por cromatografía en capa fina y espectrofotometría de cada uno de los pigmentos separados, fueron:

Clorofila a.- Máximos: 410, 420, 660.- Rf = 92

Clorofila b.- Máximos: 435, 465, 595.- Rf = 96

β -caroteno.- Máximos: 455, 482.- Rf = 100

Violaxantina.- Máximos: 540, 620, 670, 715.- Rf = 65

Se separaron otros tres pigmentos más, no bien identificados, y que quizá corresponda a Neoxantina y Luteína y α -caroteno.

c) Ultraestructura.- Ultraestructuralmente, Chlamydomonas oblonga, fijada en glutaraldehído al 3% y postfijada en Tetróxido de Osmio al 2%, presenta forma ovoide con una membrana celular, rodeada por otra celulósica y por una cápsula externa.

En el tercio anterior se encuentra el núcleo, conteniendo un gran nucleolo, cromatina ordenada en círculos y una doble membrana con poros irregulares y abundante ARN perinuclear. Próximas al núcleo, y en hundimientos del cloroplasto, se encuentran las mitocondrias. Aparato de GOLGI próximo al núcleo, formado por un dictiosoma constituido por cinco cisternas cuyos extremos aparecen dilatados en forma de vesículas. Retículo endoplásmico formado por escasas membranas alargadas, paralelamente dispuesto a la concavidad del cloroplasto, que presentan ribosomas adosados y fragmentos dispersos de retículo endoplasmático rugoso.

Un voluminoso cloroplasto, que ocupa los dos tercios del citoplasma con forma de copa, consta de discos de una μ de diámetro, que representan la unidad básica estructural de dicho cloroplasto; cada uno está formada por dos membranas unidas en sus extremos, que se comportan como membranas tilacoidales, con zonas de mayor condensación, que recuerdan a los grana. La disposición de las lamelas es muy característica, formando círculos incompletos de grupos de membranas paralelas, en torno a granos de almidón u otros productos de síntesis de tipo lipídico.

El sistema lamelar está embebido en una matriz de baja densidad que contiene además granos de almidón y un pirenoide no lamelar en el centro del cloroplasto, funcionalmente ligado a la síntesis del almidón, conteniendo túbulos que conectan con las lamelas mediante puentes membranosos.

En el extremo del cloroplasto se encuentra un estigma.

En las vecindades del pirenoide y con aspecto de microfibrillas hay acúmulos de ADN.

d) Reacción de HILL al hervir el medio control conteniendo Chlamydomonas.- Si se introduce un receptor artificial de protones y electrones el DPIP restablece la cadena vectora de protones y electrones interrumpida.

2.- Las modificaciones producidas por la acción de detergentes son las siguientes:

a) Hay una marcada inhibición del crecimiento desde 100 ppm con respecto al control, y en caso concreto del Fenopón y Lissapol ya desde 10 ppm. La proporción de 1000 ppm resulta letal en todos los casos. Estos efectos se atribuyen al gran poder tensoactivo.

b) A las 48 horas de ser tratadas por los detergentes a la concentración de 100 ppm las Chlamydomonas entran en clorosis por la desaparición de las clorofilas y marcado descenso del β -caroteno.

c) Con el tratamiento con Fenopón disminuye la consistencia de las cápsulas, que desaparecen en determinadas zonas. El pirenoide se retrae y acaba por desaparecer. No se visualizan lamelas, ya que se origina una gran destrucción del sistema de membranas.

El Lissapol modifica aún más intensamente la ultraestructura de estos Protozoos, ya que produce la casi completa homogenización del material interno, con la consiguiente lisis de los organoides citoplasmáticos.

El Dovane actúa rebajando la densidad de las membranas, por lo que no se visualizan las lamelas. La cápsula desaparece, dando la impresión de células desnudas. Sólo se aprecia un producto granular, resultante quizá de la reacción solubilizante de las membranas. En contraposición con los detergentes antes mencionados, la acción de éste no interfiere sobre el pirenoide.

El DS4499, produce modificaciones estructurales distintas a las anteriores, ya que no se solubilizan las estructuras de membranas, permaneciendo presentes en determinados lugares acúmulos de lamelas paralelas y por el claro efecto vacuolizante sobre el citoplasma, ya que se encuentran vacuolas con típicas membranas, conteniendo en su interior material poco denso y en diversos estados de desarrollo.

El SDS, es el que produce modificaciones menos intensas en la ultraestructura de Chlamydomonas, apareciendo el pirenoide disminuido de tamaño, una zona marginal rica en ribosomas y cierta lisis de las membranas.

d) El DPIP no es reducido, lo que prueba la inhibición de la fotólisis del agua bajo la acción de los detergentes, salvo en el caso del Fenopón, ya que su efecto debe de tener lugar en la cadena de citocromos del Fotosistema II, como se hace patente por el retraso en la aparición de clorosis.

3.- Cuando se añaden al medio distintas concentraciones de herbicidas las modificaciones encontradas son:

a) Los herbicidas derivados de sales de bupiridilo disminuyen sensiblemente el crecimiento a las concentraciones comprendidas entre 10 y 100 ppm, resultando letales a partir de esta última concentración.

Los derivados no nitrogenados fenoxiacéticos, estimulan, en principio, su crecimiento, comportándose como una auxina pero con un posterior efecto letal cuando las concentraciones son de 100 a 1000 ppm, debidas a agotamiento respiratorio, formación de materiales tóxicos y activación del metabolismo del fósforo.

Los derivados bromados, como el Hyvarx, actúan sobre el crecimiento a distintas concentraciones paralelamente a los controles durante los cinco primeros días, pero a partir del séptimo, existe una escasa inhibición de su crecimiento hasta la concentración de 100 ppm, siendo letal a la de 1000 ppm.

Los derivados de la urea producen un decrecimiento considerable a partir de la concentración de 100 ppm, inhibiéndolo totalmente a la concentración de 1000 ppm.

Con respecto a los derivados de las triazinas, el crecimiento disminuye con respecto a los controles en un 20%, por interferir los procesos de división a la concentración de 100 ppm.

b) A la dosis de 100 ppm, las Chlamydomonas, cultivadas durante 48 horas, presentan un descenso en la proporción de clorofila a y b, más lento a la oscuridad y que se activan con la luz, predominando los pigmentos amarillos que acaban blanqueando de modo similar a lo que ocurre en un proceso

senil normal, del que se diferencia por la mayor velocidad y orden cronológico. Los carotenoides disminuyen, aproximadamente, en un 50%. Todo esto referido a las sales de bipiridilo.

De modo similar es el efecto producido por el Hyvarx y derivados de la urea, mientras que los derivados de las triazinas reducen las clorofilas en un 5% con un ligero aumento del β -caroteno.

c) Ultraestructuralmente, las sales de bipiridilo provocan una progresiva y espectacular destrucción de los orgánulos celulares. Las mitocondrias se hinchan y rompen por efecto de la presión osmótica. La estructura tilacoidal de los cloroplastos muestra una desintegración acompañada de formación de plastoglóbulos osmiófilos, representantes quizá de acúmulos de lípidos liberados al romperse los discos.

El Trioxone conserva bien las cápsulas que recuerdan a las observadas en los controles. En el cloroplasto se modifica la disposición lamelar por la formación de zonas de vacuolización, que aumentan progresivamente y que en nada coinciden con los espacios vacíos de los controles, en los que representan una estructura reticular de sus lamelas. Estas nuevas vacuolas de material poco diferenciado presentan unas membranas mediante las cuales se comunican con el resto del cloroplasto. El citoplasma se modifica intensamente.

El Hyvarx actúa como veneno celular, provocando grandes destrucciones a nivel del cloroplasto así como en la matriz citoplasmática. Las membranas, menos destruidas que en casos anteriores, se localizan en la periferia. La matriz citoplasmática desaparece como tal, dejando en su lugar materiales residuales sin estructura visible y altamente osmiófilos. El pirenoide pierde su forma típica por destrucción lítica. Hay una gran vacuolización del citoplasma. En el núcleo, la cromatina está desdibujada por haber sido profundamente alterada.

Los derivados de la urea alteran la matriz citoplasmática, mientras que las membranas permanecen casi inalterables.

El núcleo está destruido en su componente ribonucleico. Como detalle particular, en el seno del cloroplasto aparecen zonas redondeadas de material de síntesis, de las que radialmente parten lamelas y en cuyo centro hay un acúmulo de material osmiófilo.

De todos los derivados de la urea, el que produce modificaciones más intensas es el Karmex, tanto a nivel citoplasmático como a nivel de membranas. Hay intensa vacuolización con formación de material homogéneo de mediana densidad.

Los derivados de las triazinas modifican la matriz y cloroplasto. Las membranas pierden gran parte de su individualidad, apareciendo grandes espacios vacuolares sin membranas conteniendo material homogéneo de mediana densidad. Estas vacuolas aumentan tanto de tamaño que destruyen la mayor parte del contenido celular. Se destruye el núcleo, homogeneizándose las membranas.

d) En todos los casos, y a la concentración de 100 ppm, todos los herbicidas utilizados como producto comercial inhiben la reacción de HILL, pues no hay reducción del NADP a NADPH, ni fosforilación de ADP a ATP, ya que al introducir un aceptor artificial de protones y electrones, que deberían liberarse en la fotólisis del agua, no se restablece la cadena de electrones, es decir, el DPIP no se reduce, al revés de lo observado en los controles.

VII. BIBLIOGRAFIA

- ABBOTT y ANDREWS.- Introducción a la cromatografía.- Ed. Alhambra. 1970.
- ALEKO.-
- AGLEKOBA y GOODIN.- Effect of paraquat on the nitrogen content and regrowth of coastal bermuda grass.- Agron J. N° 59. 1967.
- ALBERTSOON y LEYON.- Exp. Cell Research. 7, 288, 1954.
- ALVIN NASON.- Textbook of modern Biology.- Pag. 349-352, 1969.
- ARMSTRONG y LEVINE.- Annual review of biochemistry.- Vol 40. 1971.
- ARNON.- Photosynthesis Mechanisms of green plants.- Nat. Acad. Scy.- 1963.
- AVRON y BEN-HAYYIN.- Progress in Photosynthesis Research.- Vol 3. 1969.
- ATKINS y TCHAN.- Study of soil algae.- Plant and soil 3, 432, 1967.
- AUDUS.- The Physiology and Biochemistry of Herbicides.- 1964.
- BALEZINA.- Effect of certain herbicides on a development of soil algae. 208, 1967.
- BALICKA y KAZUBIAC.- Modo de acción de los herbicidas sobre los microorganismos del suelo. Post. Mikrobial. Polska.- 6, 15, 1967.
- BARER y COSSLETT.- Advances in optical and electron microscopy. 1970.
- BASTIN.- Fisiología vegetal.- C.E.C.S.A.- 1970.
- BAUER.- Weed Res.- 9, 81, 1969.
- BAUER.- Bevey.- Effects of paraquat on the ultrastructure of mesquite mesophyll cell. Weed Research. 9, 81, 1969.
- BELL y WOODCOCK y ARNOLD.- The diversity of Green Plants.- 1968.
- BERNSTEIN y SAHN.- Certain aspects of the sexuality of two species of Chl.- Journal of Protozoo. Vol 2, N° 3, 1955.

- BOLD.- Requisitos de Vit B-12, Histidina y Ac. Ascórbico en Chl. Biochem and Physiol. of Protozoa. 1949.
- BOUCHET.- Etude de l'influence de la nature du sol sur l'action herbicide de Simazine. Weed Research. 7, 102, 1967.
- BOUE, CHANTON.- Zoologie invertebres.- Tome 1.- 1961.
- BRECHOT.- Biochem and Physiol. of Protozoa. 47, 1937.
- BROKAW.- Decreased adenosine triphosphatase activity of flagella from a paralyzed mutant of Chl. moewusii.- Exp. cell. Res. 19, 430, 1960.
- BUETOW.- The Biology of Euglena.- Vol 1 y 11.- 1968.
- BUFFALOE, SAGER, LEWIN y FOLSON.- Cromosomas en Chl. Biochem and Physiol of Protozoa, 1959.
- CAVALIER y SMITH.- Electron Microscopic evidence for chloroplasts fusion in zygotes of Chl. reinhardii.- Nature Vol 228, 1970.
- CIRILLO.- Induced enzyme synthesis in the phytoflagellate. J. Protozoa. 3, 69, 1956.
- CROW.- The classification of some colonial Chl. New Phytol. 17, 151, 1956.
- CHATTON y LWOFF.- Hist. Nat. Belg. Fas. 3, 913, 1936.
- DALTON.- Am J. Anat. 94, 171, 1954.
- DANIEL y ARNON.- Photosyntetic phosphorylation.- Symposium GOODWIN. 1967.
- DAVENPORT.- Proc. R. Soc. B. 157, 332, 1963.
- DEKEN-GRENSON and MESSIN.- Biochim. et Biophysica acta nº27, 145, 1958.
- DODGE, HARRIS y BALDWIN.- B. C. Biochem, 118, 43, 1970.
- DODGE.- Modo de acción de los herbicidas a base de dipiridilo paraquat y diquat.- Endeavour. Vol XXX. Nº 111. 1971.
- DOGIEL.- General protozoologie.- Oxford. 1965.
- DONALD, MORELAND.- Mechanisms of, action of herbicidas. Plant Physiology, 365, 1967.
- DUPRAW.- Biología celular y molecular. 1971.
- EBERSOLD and LEVINE.- A genetic analysis of linkage group 1 of Chl. reinhardii.- Zeitschr. f, Vererbungst. 90, 74, 1959.
- EGON STAHL.- Thin layer chromatography, 269, 1967.
- EMERSON y ARNOLD.- J. Gen. Physiol. 16, 191, 1932.
- ERWIL, BLOCH.- The linoleic acid content of some photosynthetic microorganisms. Biochem. Biophys Research. 9, 103, 1963.

- FAMINTZIN.- Biol. Centralblatt.- Nº 27, 353, 1907.
- FERNANDEZ GALIANO.- Las modernas técnicas en microscopía electrónica aplicadas a la biología. Rev. Arbor Nº 133, 1957.
- FERNANDEZ GALIANO.- Una nueva clasificación de los protozoos.- Bol. R. Soc. Española de Historia Natural nº 62, 235, 1964.
- FERNANDEZ GALIANO.- Filogenia de los protozoos.- Primer simposio internacional de Zoología. Salamanca. 1969.
- FERNANDEZ RUIZ.- Tesis Doctoral. Madrid 1968.
- FLETCHER, KIRKWOOD and SMITH.- Investigation on the effect of certain herbicides on the growth of selected species of micro-algas. Colloque international 1970.
- FRANK, FRANKEL.- Biochem and Physiol. of Protozoa 88, 1931.
- FRITSCH.- The structure and reproduction of the algae.- 1935.
- CATEMBY, DALTON.- Nature 176, 301, 1955.
- GEITLER.- Enc. Plant. Physiol. 11, 530, 1959 b.
- GERLOFF.- Arch. Protistenk. 94, 311, 1940.
- GERMAN, PANOSC, PERRIN.- Etude experimentale des detergents bactericides. Sem Hop Therap. Nº 9, 510, 1965.
- GIBBONS, GRIMSTONE.- On flagellar structure in certain flagellates.- J. Biophys Biochem. Cytol 7, 697, 1960.
- GIBBS, GRIMSTONE.- On flagellar structure in certain flagellates. J. Biophys Biochem. Cytol 7, 697, 1960.
- GILLHAM, LEVINE.- Studies on the origin of SM resistant mutants in Chl. reinhardi. Genetics. 47, 1463. 1962.
- GOEDHEER.- Biochim et Biophys Acta 27, 478, 1958.
- GOODENOUGH, ARMSTRONG y LEVINE.- Plant Physiol. 44, 1001, 1969.
- GOODWIN.- Chemistry and Biochemistry of plant pigments. Vol, 58, 564, 1965.
- GRANICK.- Nutritional control of Sexuality in Chl. reinhardi. J. Gen. Physiol. 37, 729, 1954.
- GRASSE.- Traité de Zoologie. Tome I, Fasc. 1. 1954.
- GUILLARD.- A mutant of Chl. moewusii. J. of Protozoology, Vol. 7, 262, 1960.
- HAGUENAU and BERNARD.- Arch. and micr. et morphol. exp. 44, 27, 1955.
- HARTSHORNE.- New Phytologist. 52, 292, 1953.
- HAYAT.- Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications, Vol. 1, 1971.
- HEATH y PACKER.- Arch. Biochem. Biophys. 125, 189, 1968.

- HILTON.- Photosynthesis and the HILL reaction. *Plant Physiol.* 1966.
- HOLDEN.- *Plant.* Vol. 58, 564, 1965.
- HOLLANDE.- Los plastos. *Biol. Gen.* GRASSE. 1970.
- HOOPER, SIEKEVITZ y PALADE.- *J. Biol. Chem.* 244, 2621, 1969.
- HOIMES y MAST.- Phototaxis in *Volvox*. *Biol. Bull.* 4, 319, 1903.
- HUTNER.- *Biochemistry and Physiology.* Vol. 3. 1964.
- HUMMEL.- Identification and analysis of surface active agents. Vol. 6, 1962.
- IWAMURA.- *Biochim et Biophysica acta.* 42, 161, 1960.
- ITOH, IZAWA and SHIBATA.- *Buochim et Biophys. Acta.* 66, 319, 1963.
- IAGENDORF y MARGULIES.- *Arch. Biochem. Biophys.* 90, 184, 1960.
- JONES, TIBBS, LEWIN.- The chemical nature of the flagella of *Chl. moewusii*. *Exp. Cell Research.* 19, 408, 1960.
- KAJA.- *Protoplasma.* 44, 136, 1954.
- KARTER.- *Pub. Zool. Univ of California* 33, 125, 1929.
- KEARNEY y KAUFMAN.- Degradation of herbicides. *Marcel Decker* 1969.
- KUDO.- *Tratado de Zoología,* 1970.
- LEDERBERG.- *J. Physiol Rev.* 32, 403, 1952.
- LEOPOLD.- *Auxins and plant growth,* Berkeley. 1955.
- LEVINE y EBERSOLD.- Gene recombination in *Chl. reinhardi*. *Symp on Quant Biol.* 23, 101, 1958.
- LEWIN.- The genetics of *Chl. moewusii*. *Genetics* 51, 543, 1953.
- LEYON.- *Exp Cell Research.* 6, 497, 1953.
- LICHTENTHALER.- *Endeavour,* 27, 144, 1968.
- LIPNICKAJA y KRUGALOW.- Effect of triazine herbicides in soil algae. *Conference in Kirowsk.* 222, 1967.
- LOSADA, WHASLEY y ARNON.- Separación de dos pigmentos. *Nature* 190, 606, 1961.
- LUCKSCH.- *Biochemistry and Physiology of Protozoa* (1932), LWOFF Pag. 86, 1951.
- MAUWELL.- *Introduction to Protozoology,* 1951.
- MENDOZA.- *Tesis Doctoral,* 1971.
- MEES.- *Ann. Appl. Biol.* 48, 601, 1960.
- MERESCHKOWSKI.- *Biol. Centrablatt.* 25, 593, 1905.
- MICHAELIS y HILL.- *J. Gen. Physiol.* 16, 859, 1933.

- MOEWUS.- Sexualidad en Chlamydomonas, Biochem and Physiol of Protozoa. 1940.
- MORELAND.- Some factors influencing the herbicidal efficiency of MCPA and MCPB in thrae species of microalgae. Weed Res. 10, 3, 1967.
- NEWTON.- The reversible interaction of S.D.S. with bacterial Chromatophores. J. Biological Chemistry. Vol. 239, N° 5 1964.
- NOVOGRUDSKAJA, ISAERA, PERVUSHINA.- Efectos de los herbicidas sobre la microflora del suelo. Agrobiología SSSR. 4, 577, 1966.
- OHAD, SIEKEVITZ y PALADE.- J. Cell Biol. 35, 553, 1967.
- OSWALD.- Proc Third Conf on Biological Waste treatment, Manhattan College. 1960.
- PANTERA.- The effect of herbicides on algae in the soil. Colloque international 847, 1970.
- PASCHER.- Los fitoflagelados, 1916.
- PETROCELLIS, SIEKEVITZ y PALADE.- J. Cell Biol. 44, 618, 1970.
- PITELKA.- Electron-microscopic structure of Protozoa, Vol. 13. 1963.
- PLATONOWA.- Effect of 2,4-D simazine and prometryne on soil algae. Conference in Kirowsk. 215, 1967.
- POCHON y VOETS.- Action des pesticides et herbicides sur la microflore et la faune du sol. Biodegradation tellurique de leurs molecules. Colloque International 1970.
- PRESTON y KAYPER.- J. Exp. Bot., 2, 247, 1951.
- PRIMO YUFERA.- Herbicidas y fitorreguladores. Aguilar 1958.
- PROVASOLI.- Quant Biol. 16, 113, 1951.
- RAVINOWITCH y WEISS.- J. Proc. Roy Soc. (London) Ser A 162, 251. 1937.
- RIS y PLANT.- Ultraestructure of DNA containing areas in the chloroplast of Chl. J. of Cell Biology, Vol. 13, 383, 391. 1962.
- ROBERTIS, NOWINSKI y SAEZ.- Biología Celular. Buenos Aires, 1971.
- ROBSON.- The secpnd International Symposium on the controls of Aquatics Weeds. Weed Research 8, 72. Oldenburg, 1967.
- RODRIGUEZ LOPEZ y MUÑOZ CALVO.- Efectos paradójicos de anti bióticos inhibidores de la Proteosíntesis sobre microor ganismos fotosintéticos. 1^{er} Centenario de la R.S. de H. Natural. 1971.
- ROKIN y BURETZ.- Motillity and power dissipation in flagella ted cells especially Chl. Biol. Bull 116, 285. 1960.

- RONKIN y BURETZ.- Sodium o potasium in normal paraliced Chl. J. Protozoology. Vol. 7, n° 2, 109, 1960.
- ROSEN y GOLDSMITH.- Systematic analysis of surface-active agents. Chemical Analysis. Vol. 12, 1960.
- ROSENBERG.- Photosynthesis. 1965.
- SAGER.- Inheritance in the green alga Chl. reinhardi. Genetics. 40, 476. 1955.
- SAGER y GRANICK.- Ann, New York Acad. Sc. 56, 831, 1953.
- SAGER y ISHIDA.- Análisis genético: Ciclo vital en Chl. reinhardi. Biochem and Physiol of Protozoa. Hutner Vol. III, 1963.
- SAGER y PALADE.- Exp. Cell. Research. 7, 584, 1954.
- SAGER y PALADE.- Structure and development of the chloroplast in chlamydomonas. J. Biophysic and Biochem. Cytol. Vol. 3, n° 3, 463, 1957.
- SCARTH.- J. Exp. Physiol. 14, 115, 1924.
- SCOTT y WILKNIS.- Auxin Transport in Roots. Nature Vol. 219, 1388, 1968.
- SCHEER y KIDDER.- Chemical Zoology Protozoa. Vol. 1, 1967.
- SJÖSTRAND and HANZON.- Exp. Cell Research. 7, 415. 1954.
- SMITH.- Fresh-Water Algae of the United States. Book Company. 1950.
- SOBIESZCZANSKI.- The influence of different herbicides upon the growth and development of celulolytic microorganisms. Annales del Instituto Pasteur. n° 4, 115. 1968.
- STEINMANN y SJÖSTRAND.- Exp. Cell. Research. 8, 15, 1955.
- ATRAIN y THOMAS.- Chloroplast pigments and photosynthesis in deuterated green algae. Annals New York A. Sc. Vol. 84, 617, 1960.
- TARRANT y TATTON.- Organochlorine pesticides in rain water in the British Isles. Nature Vol. 218. n° 5155, 725, 1968.
- TIBBS.- The nature of algal and related flagella. Biochim. Biophys. Acta. 23, 275, 1957.
- TSUBO.- Chemotaxis and sexual behavior in Chl. J. Protozoa. 8, 114. 1961.
- TSE-TUAN CHEN.- Research in Protozoology. Vol. 2 y 3. 1967.
- VICENTE CORDOBA.- Tesis doctoral, 1969.
- WESSELS.- The action of somes derivates od phenylurethan and of 3-4, phenyl-1,1-dimethylurea on the HILL reaction. Biochim. Biophys. Acta. 19, 548, 1956.
- WETTSTEIN.- Tratado de botánica sistemática. 1944.

WILCOX and MORELAND.- Habicidal activity correlates quite well with inhibitory activity againts the HILL reaction for a series of ureas semicarbacides. Nature Vol. 222, 878, 1969.

WOLKEN and PALADE.- Ann. New York. Ac. Sc. 56, 873, 1953.

WOLKEN.- Euglena. 1967.

YOCUM y SAN PIETRO.- Biochem. Biophys. Res. Cmmun. 36, 614, 1969.

ZWEIG, SHAVIT y AVRON.- Biochim. Biophys. Acta, 109. 332, 1965.