



UNIVERSIDAD DE A CORUÑA
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Celular y Molecular
Área de Microbiología

Toxicidad de antibióticos utilizados en acuicultura sobre una microalga marina

Carlos María Rodríguez López
A Coruña, 2014

El presente trabajo Fin de Grado ha sido realizado en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña, bajo la dirección de María Concepción Herrero López, Profesora Titular de Universidad de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña.

Índice

1. Introducción	3
2. Objetivo	5
3. Materiales y métodos	6
3.1 Descripción de la especie utilizada	6
3.2 Cultivo microalgal	6
3.3 Antibióticos	7
3.4 Determinación de la densidad celular	8
3.5 Determinación espectrofotométrica de pigmentos	8
3.6 Determinación de proteínas	9
3.7 Análisis de la actividad celular	9
3.8 Diseño experimental	10
3.9 Análisis estadístico	11
4. Resultados y discusión	12
4.1 Crecimiento	12
4.2 Pigmentos	15
4.3 Proteínas	18
4.4 Actividad celular	19
5. Conclusiones	21
6. Bibliografía	22

1. Introducción

Los antibióticos son moléculas biológicamente activas con un uso creciente en la medicina humana y veterinaria. Muchos de ellos se usan habitualmente como agentes terapéuticos en la industria ganadera, en la agricultura moderna y en la acuicultura. En esta última pueden ser aplicados directamente en el agua o ser incorporados en el alimento (Hirsch et al., 1999; Shao, 2001). En ambos casos, sus metabolitos y productos de degradación llegan al medio ambiente circundante y pueden causar efectos adversos sobre los organismos que lo habitan. La administración de los antibióticos por medio del alimento ha sido considerada la forma más conveniente de medicar a los peces de cultivo (Shao, 2001). Sin embargo, una parte considerable de la comida que se les administra no es consumida, especialmente en el caso de los peces enfermos que tienden a tener menor apetito y, por lo tanto, gran parte de esta comida medicada se desperdicia (Kennedy et al., 2000). Además, la medicación puede pasar a través del sistema digestivo de los peces y excretarse sin sufrir cambios (Kennedy et al., 2000) o ser eliminada en forma de metabolitos tóxicos. En la piscicultura intensiva, en torno a un 70-80% de los antibacterianos suministrados como gránulos de pienso terminan en el medio ambiente (Hektoen et al., 1995). Además, en muchos casos estos antibióticos también pueden llegar al medio ambiente debido a que no son degradados completamente en las plantas de tratamientos de aguas residuales (Lanzky y Halling-Sorensen, 1997; Hartmann et al., 1998; Arslan-Alaton y Caglayan, 2006).

Aunque los niveles que se registran en los estudios son generalmente bajos (de ng l^{-1} a $\mu\text{g l}^{-1}$ en aguas y de $\mu\text{g kg}^{-1}$ a mg kg^{-1} en suelos y sedimentos), los antibióticos son considerados contaminantes "pseudopersistentes" debido a la continua liberación al medio ambiente y su presencia permanente (Daughton y Ternes, 1999; Hernando et al., 2006).

Además de los riesgos para la salud humana debidos a la existencia de un número cada vez mayor de bacterias resistentes a los antibióticos en el medio ambiente (Kim y Aga, 2007; Kümmerer, 2009), y la presencia no deseada de los antibióticos en el agua potable (Zuccato et al., 2000; Vosotros et al., 2007), existe una creciente preocupación por el riesgo ecológico de los antibióticos en el medio ambiente acuático, ya que, aunque los antibióticos son aplicados para combatir bacterias patógenas, también constituyen un riesgo potencial para los microorganismos indígenas. Estos microorganismos no diana desarrollan en el ecosistema funciones muy importantes, como el ciclo de nutrientes, la mineralización de materia orgánica y la degradación de contaminantes (Näslund et al., 2008). Además, afectan también a los productores primarios, como las microalgas y las cianobacterias, que son especialmente vulnerables a los antibióticos (Cabello, 2006; Mutilar et al., 2006).

Hay que destacar que los organismos acuáticos pueden estar expuestos a mezclas de antibióticos. Mientras que las concentraciones individuales de antibióticos en los

ambientes acuáticos suelen ser bajas y pueden no suponer un riesgo ecológico para los organismos acuáticos, las concentraciones combinadas de los antibióticos pueden provocar que la toxicidad sea significativa para ellos. Además, los productos químicos en una mezcla pueden interactuar de forma sinérgica, por lo que es esencial investigar las interacciones potenciales en las mezclas de antibióticos de diferentes clases (Cleuvers, 2003; Teuschler, 2007; Rodea-Palomares et al., 2010). Esta cuestión tiene implicaciones importantes en términos de toxicidad ambiental y en las estrategias de evaluación de riesgos, ya que en la mayoría de los casos sólo se considera el efecto individual de estos antibióticos, pudiendo subestimar seriamente el riesgo asociado a las mezclas de los antibióticos, así como las mezclas entre antibióticos y otros fármacos o contaminantes antropogénicos como los metales (Kolpin et al., 2002).

2. Objetivo

Trabajos anteriores realizados en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña evaluaron el efecto tóxico de algunos de los antibióticos más utilizados en acuicultura sobre la microalga marina *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. En base a los resultados obtenidos en ensayos individuales con estos antibióticos se plantea el estudio de los efectos de mezclas de los mismos.

El objetivo general de este trabajo es evaluar el potencial efecto tóxico y sinérgico de las mezclas de algunos de los antibióticos más utilizados en acuicultura sobre la microalga marina *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch.

Este objetivo se abordará mediante el estudio de la toxicidad ejercida por concentraciones inhibitorias que producen el 50% de mortalidad (IC_{50}) de las mezclas de tres antibióticos - cloranfenicol (CLO), oxitetraciclina (OTC) y florfenicol (FLO) - sobre *T. suecica*. Se evaluará su efecto sobre el crecimiento, composición bioquímica en pigmentos y proteínas y actividad celular, medida como actividad esterasa.

3. Materiales y métodos

3.1 Descripción de la especie

La especie utilizada en el presente estudio ha sido *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. *T. suecica* se clasifica en la clase *Prasinophyceae*, dentro de la división *Chlorophyta*. Es una microalga marina unicelular móvil de color verde debido a la presencia de clorofilas *a* y *b*. Posee una forma generalmente oval y su tamaño celular está comprendido entre 10 – 15 μm de longitud y entre 7 – 9 μm de diámetro. Presenta cuatro flagelos isodinámicos que salen de una invaginación apical de la porción anterior de la célula que está ubicada en la misma dirección en la que avanza (Fig. 1A). La cubierta celular está formada por una teca compuesta por 2 - 3 estratos producidos por partículas escamosas de aspecto cristalino que derivan del aparato de Golgi. Posee un núcleo central, un plasto acopado lobulado en la parte anterior y un pirenoide basal (Fig. 1B). La reproducción se realiza por división celular binaria, momento en el cual las células pierden el estado móvil, y las dos células hijas ya están completamente flageladas antes de la liberación de la teca (Butcher, 1959).

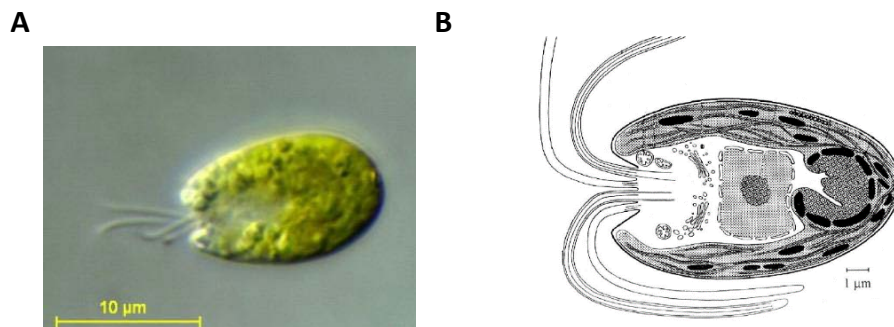


Figura 1. Fotografía (A) y estructura celular (B) de *Tetraselmis* sp.

T. suecica es una especie muy utilizada en acuicultura y es considerada como el flagelado marino más fácil de cultivar a gran escala. Se emplea como alimento para larvas de moluscos y crustáceos, con un valor nutritivo considerable por su excelente composición en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Fábregas *et al.*, 2001). La cepa microalgal utilizada en el presente trabajo fue aislada de las aguas de la Ría de Arousa (NO España) (Fábregas, 1984) y mantenida en laboratorio en las condiciones que se describen en el siguiente apartado.

3.2 Cultivo microalgal

Los cultivos de *T. suecica* se realizan en agua de mar filtrada por 5 μm y esterilizada en autoclave a 120 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos. Como medio de cultivo se emplea medio Algal-1 preparado a partir de una solución de macroelementos y otra de oligoelementos realizadas en agua destilada. Ambas soluciones son esterilizadas en autoclave.

Posteriormente se mezclan en condiciones de esterilidad y el medio completo se almacena refrigerado a 4 °C.

Los cultivos *stock* se realizan en botellas Pyrex de 1 l y se mantienen con aireación en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas de luz y temperatura. La iluminación, de 68.25 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$, es proporcionada por tubos fluorescentes Philips TLD de 36 W y aplicada con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La temperatura se mantiene constante a 18 ± 1 °C. El aire inyectado a los cultivos es filtrado mediante filtros Millipore FG de 0.20 μm de tamaño de poro.

3.3 Antibióticos

La oxitetraciclina es un antibiótico de amplio espectro perteneciente a la familia de las tetraciclinas cuyo mecanismo de acción se basa en inhibir la síntesis proteica bacteriana fijándose a la subunidad 30 S del ribosoma. De este modo, impide la fijación del aminoacil-ARNt al sitio A, bloqueando el primer paso de la fase de elongación (Pratt, 1981; Chopra y Roberts, 2001).

El florfenicol es un antibacteriano de amplio espectro de la familia de los fenicoles. Químicamente es un derivado monofluorado del tianfenicol, un análogo del cloranfenicol que posee un rango de actividad similar. Sin embargo, el florfenicol no conlleva riesgo de inducir anemia aplásica en humanos, fenómeno asociado con el cloranfenicol. Su sitio de acción es la subunidad ribosomal mayor (50 S), impidiendo la formación del enlace peptídico e interrumpiendo la síntesis proteica en el segundo paso de su fase de elongación (Marconi *et al.*, 1990).

El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro antimicrobiano que inhibe la síntesis proteica a nivel de la subunidad 50 S del ribosoma bacteriano, impidiendo la formación de puentes peptídicos en la cadena de elongación. Ha sido un antibiótico de uso frecuente en las *hatcheries* para el control del crecimiento microbiano en cultivos larvarios de pectínidos, sobre todo en países de Sudamérica (Uriarte *et al.*, 2001).

La oxitetraciclina y el florfenicol son antibióticos utilizados con frecuencia para el tratamiento de las principales patologías de origen bacteriano que afectan a peces en las piscifactorías españolas: vibriosis, yersiniosis o enfermedad de la boca roja, forunculosis, enfermedad de la columna o pasteurelosis, etc. (Blanco *et al.*, 2004). Los antibióticos utilizados en este estudio son comercializados por Sigma Aldrich. Para preparar las soluciones *stock*, se disuelven los antibióticos en agua destilada estéril y posteriormente se filtra esta solución con un filtro de acetato de celulosa de 0.20 μm de tamaño de poro. Dichas soluciones se preparan *de novo* al inicio de cada experiencia. Para realizar las mezclas de los diferentes antibióticos hemos utilizado la Concentración Inhibitoria Media (Inhibitory Concentration 50%; IC50), es decir, la concentración de la sustancia ensayada necesaria para causar una inhibición de crecimiento del 50% con respecto al control, obtenidas en Seoane, 2014 (Tabla 1).

	CLO	FLO	OTC
<i>Tetraselmis suecica</i>	11,16	9,03	17,25

Tabla 1. Valores de IC₅₀ en mg l⁻¹ (96 h) obtenidos en Seoane, 2014.

3.4 Determinación de la densidad celular

La densidad celular (células ml⁻¹) de los cultivos se determina diariamente mediante recuento en cámara Improved Neubauer de una alícuota de cada uno de los cultivos utilizando un microscopio óptico de contraste de fases (NIKON Lapophot). Las células se fijan con una mezcla de glutaraldehído y paraformaldehído en un volumen del 10% con respecto a la muestra tomada del cultivo. En caso de muestras muy concentradas se efectuaron las diluciones necesarias.

Se calculan las tasas de crecimiento para cada tiempo y concentración de antibiótico ensayado (μ) expresadas en día⁻¹ mediante la siguiente fórmula:

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

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

3.5 Determinación espectrofotométrica de pigmentos

Para el análisis espectrofotométrico del contenido en pigmentos de *T. suecica*, se recogen las células por centrifugación de un volumen determinado de cultivo en una centrífuga refrigerada ALC PK121R a 8000 *g* durante 20 min a 4 °C. Se retira el sobrenadante y la biomasa se resuspende en un volumen conocido de acetona-metanol 2:1. Se mantienen de este modo durante 24 h a 4 °C y en oscuridad para que la extracción sea completa. Tras este tiempo, se centrifuga de nuevo para retirar los restos celulares y se recoge el sobrenadante que contiene los pigmentos extraídos. Se realizan lecturas de absorbancia a 664, 647 y 480 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Shimadzu UV- 1700, frente a un blanco de acetona-metanol 2:1.

El valor de los coeficientes y la longitud de onda a la cual se produce la máxima absorción varían en función del solvente utilizado (Parsons y Strickland, 1965) y de la microalga empleada. De los propuestos hasta ahora, se han adoptado los de Jeffrey y Humphrey (Jeffrey y Humphrey, 1975) para las clorofilas y los de Strickland y Parsons (1972) para los carotenoides totales, ambos usando acetona-metanol 2:1 como solvente.

Las ecuaciones utilizadas para el cálculo de las concentraciones de pigmentos en el extracto son:

$$\text{Clorofila } a = 11.93 A_{664} - 1.93 A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b = 20.36 A_{647} - 5.5 A_{664}$$

$$\text{Carotenoides totales} = 4 A_{480}$$

donde las clorofilas a y b y los carotenoides totales representan concentraciones de dichos pigmentos en $\mu\text{g ml}^{-1}$ de extracto y A_{664} , A_{647} y A_{480} representan las absorbancias (D.O = $\log I_0/I$) medidas a 664, 647 y 480 nm, respectivamente.

3.6 Determinación de proteínas

Para la cuantificación de la concentración de proteínas hidrosolubles presente en las células de *T. suecica* se ha elegido el método de Bradford (1976). Este método se basa en el cambio de color diferencial del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteína. El máximo de absorbancia para una solución ácida de dicho colorante cambia de 465 a 595 nm cuando se produce el enlace a una proteína, principalmente a residuos de aminoácidos aromáticos. Este método cuantifica proteínas y polipéptidos cuyo peso molecular sea superior a 3 kDa. El complejo proteína-colorante tiene un alto coeficiente de extinción, lo cual proporciona sensibilidad al ensayo.

En este trabajo se ha utilizado el reactivo preparado comercialmente por BioRad en el producto *Protein Assay Kit*.

Las células de *T. suecica* se recogen por centrifugación en una centrifuga refrigerada ALC PK121R a 4500 rpm durante 20 min a 4 °C. Se retira el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 5 ml de agua destilada con ayuda de un vórtex. Esta suspensión celular se somete a un sonicación utilizando un sonicador Labsonic durante dos minutos. A continuación, se centrifuga de nuevo para retirar los restos celulares. El extracto celular se diluye convenientemente en agua destilada y se cuantifica su contenido proteico. Para ello, se prepara una recta de calibrado con concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) entre $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ y $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ en agua destilada frente a un blanco también de agua destilada. La reacción colorimétrica se inicia añadiendo colorante azul de Coomassie en una relación muestra:reactivo 4:1 (v:v) a cada una de las muestras, y agitando suavemente. Las medidas de absorbancia se realizan en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 a 595 nm.

Todo el proceso de extracción se realiza inmediatamente antes del análisis del contenido proteico.

3.7 Análisis de la actividad celular

El diacetato de fluoresceína (*Fluorescein diacetate*; FDA), es un éster no polar, no fluorescente y lipofílico que penetra libremente en las células vivas, atravesando las membranas celulares. Tras entrar en las células, esterasas no específicas

citoplasmáticas hidrolizan los enlaces éster de la molécula de FDA perdiendo así los residuos acetato. La fluoresceína libre resultante es una molécula polar, hidrofílica, que emite fluorescencia en el espectro del verde cuando se excita con luz azul (488 nm) y que es retenida por las células cuando la membrana plasmática está intacta. En este caso, la ausencia de fluorescencia verde de la fluoresceína, en células viables con la membrana celular intacta, indicaría efectos tóxicos sobre la actividad de las esterasas, que son enzimas esenciales para el funcionamiento normal de la célula (Jochem, 2000). De este modo, analizando si existen diferencias en la fluorescencia emitida por las células metabólicamente activas, podremos detectar posibles alteraciones de la actividad celular.

Para la medida de la actividad celular, se toman por duplicado alícuotas de cada cultivo a las que se añade FDA a una concentración final de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. A una de las réplicas se le añade inmediatamente acetona (concentración final de 50% v/v) para parar la reacción y se guarda a 4°C y en ausencia de luz. La otra réplica se incuba a temperatura ambiente durante el tiempo suficiente. Tras la incubación se añade acetona (concentración final de 50% v/v) para parar la reacción. Las suspensiones celulares a tiempo 0 y después de la incubación se centrifugan en una centrífuga refrigerada ALC PK121R a 4500 rpm durante 20 min a 4°C y se mide la absorbancia de los sobrenadantes a 490 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 a 595 nm frente a un blanco de agua destilada. Del valor de absorbancia obtenido después del tiempo de incubación se resta la absorbancia obtenido en tiempo 0. Se calcula la actividad del extracto a partir de una recta patrón con concentraciones de fluoresceína entre $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ y $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ en agua destilada frente a un blanco también de agua destilada. Los resultados de actividad se expresan en $\mu\text{g ml}^{-1}$ de fluoresceína por millón de células y por hora.

3.8 Diseño experimental

Para evaluar los potenciales efectos tóxicos de las distintas mezclas de los antibióticos sobre la microalga *T. suecica* se realizan experiencias de 96 horas de duración en las que las células son expuestas a distintas combinaciones de los antibióticos ensayados. Además, se realizan controles sin antibiótico. Los cultivos se establecieron a partir de un inóculo en fase de crecimiento exponencial y se prepararon en tubos *Kimax* conteniendo 45 ml de cultivo a una densidad inicial de 5×10^4 células ml^{-1} . Se mantuvieron sin aireación a las mismas condiciones de luz y temperatura descritas anteriormente para los cultivos *stock*. Se realizaron tres réplicas de cada combinación y del control. Cada 24 horas se toman muestras de cada uno de los cultivos para la determinación de la densidad celular. Los análisis de pigmentos, contenido en proteínas y actividad celular se realizaron a las 48 horas y/o 96 horas.

3.9 Análisis estadístico

Para todos los parámetros analizados, se calculan las medias y las desviaciones estándar de cada tratamiento y de los controles.

Para el tratamiento estadístico de los datos se utiliza el programa IBM SPSS Statistic versión 21.0.0. En cada experiencia, la hipótesis de que la concentración de antibiótico del medio no afecta al parámetro de estudio se analiza mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) a un nivel de confianza del 95%. Cuando la hipótesis se rechaza, se utiliza el test de rango múltiple de Tukey para analizar de qué forma afecta cada concentración de antibiótico al parámetro estudiado. El test de Tukey se aplica en todos los casos al nivel de significación 0.05 ($p < 0.05$).

Las gráficas se realizan con el paquete de análisis estadístico y de gráficas avanzadas SigmaPlot versión 12.0.

4. Resultados y discusión

4.1 Crecimiento

Uno de los parámetros estudiados para determinar la toxicidad de estos antibióticos frecuentes en acuicultura sobre *Tetraselmis suecica* fue el crecimiento.

En los últimos años se han venido desarrollado bioensayos basados en nuevos parámetros y métodos cada vez más rápidos, sencillos, prácticos y sensibles para la detección de contaminantes y el estudio de su toxicidad, pero el crecimiento sigue siendo el parámetro más utilizado hasta la fecha para estudiar los efectos de compuestos tóxicos sobre las microalgas en los ensayos de toxicidad crónicos (van Wezel y van Vlaardingen, 2004). La determinación de la densidad celular o número de células como medida del crecimiento microalgal es un parámetro fundamental en los ensayos de toxicidad de cualquier agente. En numerosos ensayos, la toxicidad se mide en función de la reducción de la tasa de crecimiento o de la biomasa final, en relación a un control (Hogan *et al.*, 2005; Debelius *et al.*, 2008; Nie *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009; Strom *et al.*, 2009). Hay estudios en los que se concluye que este parámetro es menos sensible que otros como la morfología celular o la producción fotosintética (Geoffroy *et al.*, 2007), pero existen otros trabajos cuyos resultados indican que el crecimiento es el parámetro más sensible dentro de los estudiados (Franklin *et al.*, 2001a; Franklin *et al.*, 2001b; Strom *et al.*, 2009), aunque esto depende del organismo, del contaminante y de los parámetros estudiados.

Los resultados del presente estudio reflejan que el crecimiento de *T.suecica* se ve afectado por la presencia de los antibióticos ensayados en el medio de cultivo. Las curvas de crecimiento de los cultivos microalgales expuestos a las diferentes mezclas de los fármacos se muestran en la Fig.2.

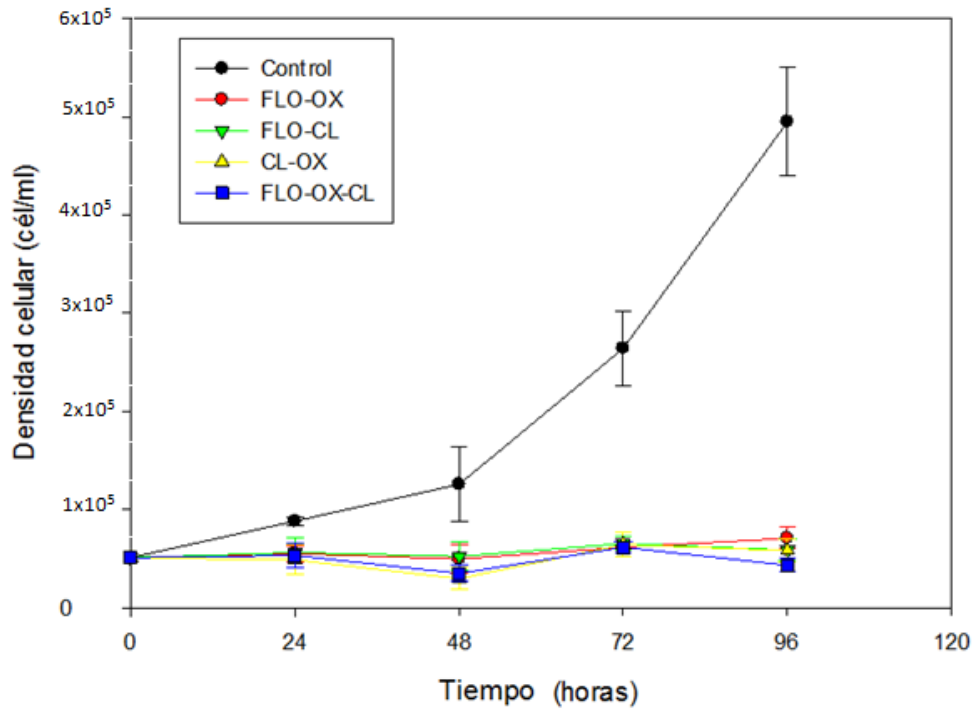


Figura 2. Curvas de crecimiento de los cultivos de *T. suecica* en ausencia de fármaco (Control) y con diferentes mezclas de fármacos. Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar. FLO-OX: floranfenicol y oxitetraciclina; FLO-CL: floranfenicol y cloranfenicol; CL-OX: cloranfenicol y oxitetraciclina; FLO-OX-CL: y floranfenicol, cloranfenicol y oxitetraciclina.

La curva de crecimiento del cultivo control experimentó una fase lag o de latencia entre las 0-48 horas. A partir de las 48 horas el número de células aumenta exponencialmente hasta alcanzar una densidad celular final a las 96 h de $4,95 \times 10^5 \pm 0,55 \times 10^5$ células ml^{-1} .

Los resultados muestran que todos los tratamientos con antibióticos ensayados ejercen un efecto negativo sobre el crecimiento de *T. suecica* con respecto al control, siendo en todos los casos las diferencias significativas. Sin embargo, no hay diferencias significativas entre el crecimiento obtenido en los diferentes tratamientos entre sí, con valores de densidad celular final entre $4,3 \times 10^4 \pm 0,69 \times 10^4$ células ml^{-1} y $7,1 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$ células ml^{-1} .

Los valores de la tasa de crecimiento a las 96 horas de cultivo se representan en la Tabla 1:

Cultivo	Tasa crecimiento (día ⁻¹)
Control	0,82±0,04008024
FLO-OX	0,12±0,05623484
FLO-CL	0,047±0,06551387
CL-OX	0,042±0,07564394
FLO-OX-CL	0,063±0,05969899

Tabla 1. Tasas de crecimiento del cultivo control y de los cultivos con diferentes tratamientos con antibióticos. Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar. FLO-OX: floranfenicol y oxitetraciclina; FLO-CL: floranfenicol y cloranfenicol; CL-OX: cloranfenicol y oxitetraciclina; FLO-OX CL: y floranfenicol, cloranfenicol y oxitetraciclina.

Los resultados obtenidos siguen el mismo patrón que las curvas de crecimiento, diferenciándose significativamente los valores obtenidos en el cultivo control con respecto al resto de tratamientos con antibióticos.

Si consideramos el porcentaje de inhibición del crecimiento producido por los distintos tratamientos, considerando el crecimiento del control como el 100% (Fig.3) se observa que aumenta a lo largo del tiempo de cultivo, con valores de 20% a las 24 horas y que llegan hasta el 90% después de 96 horas de cultivo.

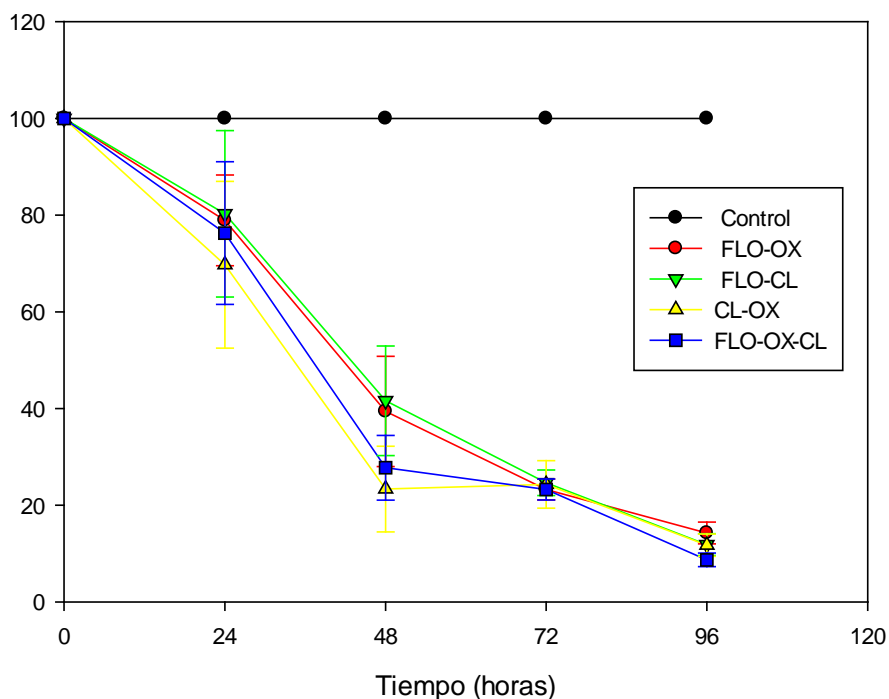


Figura 3. Inhibición del crecimiento producido por los distintos tratamientos, considerando el crecimiento del control como el 100%. Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar. FLO-OX: floranfenicol y oxitetraciclina; FLO-CL: floranfenicol y cloranfenicol; CL-OX: cloranfenicol y oxitetraciclina; FLO-OX CL: y floranfenicol, cloranfenicol y oxitetraciclina.

Se observa que todos los cultivos tratados con antibióticos se ven inhibidos y que, a lo largo del tiempo, las diferencias entre estos y el control se acentúan aunque, nuevamente, no existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos entre sí.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio reflejan que todos los tratamientos antibióticos afectan significativamente y de forma negativa al crecimiento de la microalga marina *T. suecica*.

Comparando estos resultados con los resultados obtenidos en otros estudios en los que sólo se usa un antibiótico (De Orte et al., 2013; Ferreira et al., 2007; Lai et al., 2009; Seoane, 2014) se observa un efecto sinérgico de estos antibióticos cuando se usan conjuntamente. En estos estudios con diversas microalgas marinas, las IC_{50} tienen valores que varían entre 4 y 41 $mg\ l^{-1}$ para cloranfenicol, 6,06 y 9,03 $mg\ l^{-1}$ para florfenicol y 1,73 y 17,25 $mg\ l^{-1}$ para oxitetraciclina, por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio reflejan que utilizando para la realización de las mezclas las IC_{50} de estos antibióticos se obtienen valores de inhibición superiores al 50%.

Como se ha dicho anteriormente, en diversos estudios ecotoxicológicos se concluye que el crecimiento es menos sensible que otros parámetros como la morfología celular o la producción fotosintética, porque la inhibición del crecimiento refleja un valor medio de la población estudiada sin tener en cuenta la respuesta que se produce a nivel celular (Geoffroy et al., 2007). Puesto que los cambios ambientales afectan directamente a las células, antes de que se manifieste el efecto sobre la población, resulta conveniente la medida de otros parámetros celulares, como la medida de pigmentos y proteínas, y la actividad celular.

4.3 Pigmentos

A lo largo de la pasada década, los marcadores bioquímicos, moleculares y celulares se han utilizado frecuentemente para la monitorización de la contaminación en ambientes acuáticos. Concretamente, los marcadores bioquímicos han sido seleccionados entre los eventos moleculares tempranos que tienen lugar en respuesta a los mecanismos toxicológicos de los principales contaminantes (Banni et al., 2005), ya que los diversos metabolitos presentes en la célula no son más que los productos finales de procesos regulatorios celulares, y sus niveles se pueden considerar como la respuesta de los sistemas biológicos a los cambios ambientales (Jamers et al., 2009).

Los antibióticos ensayados son ampliamente usados en acuicultura en el tratamiento de enfermedades bacterianas porque actúan a nivel de las subunidades mayores o menores del ribosoma procariota, por ello, los cloroplastos son el lugar de acción primario de estos antibióticos en las células de los organismos fotosintéticos, de manera que resulta interesante estudiar el efecto que tiene la exposición a estos

antibióticos en el contenido de pigmentos fotosintéticos de *T. suecica*. Además, el contenido de pigmentos es frecuentemente utilizado como biomarcador de exposición a diversos tóxicos en microalgas (Couderchet y Vernet, 2003) y en otros estudios se demostró que la pérdida de clorofilas está asociada a estrés ambiental (Hendry y Price, 1993).

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que tras 48 horas de exposición a cualquiera de las mezclas de antibióticos el contenido celular de los diferentes pigmentos fotosintéticos de *T. suecica* no es significativamente distinto, sin embargo, tras 96 horas de exposición el contenido celular de los pigmentos fotosintéticos de *T. suecica* se reduce significativamente con respecto al observado en las células de los cultivos control (Fig. 4).

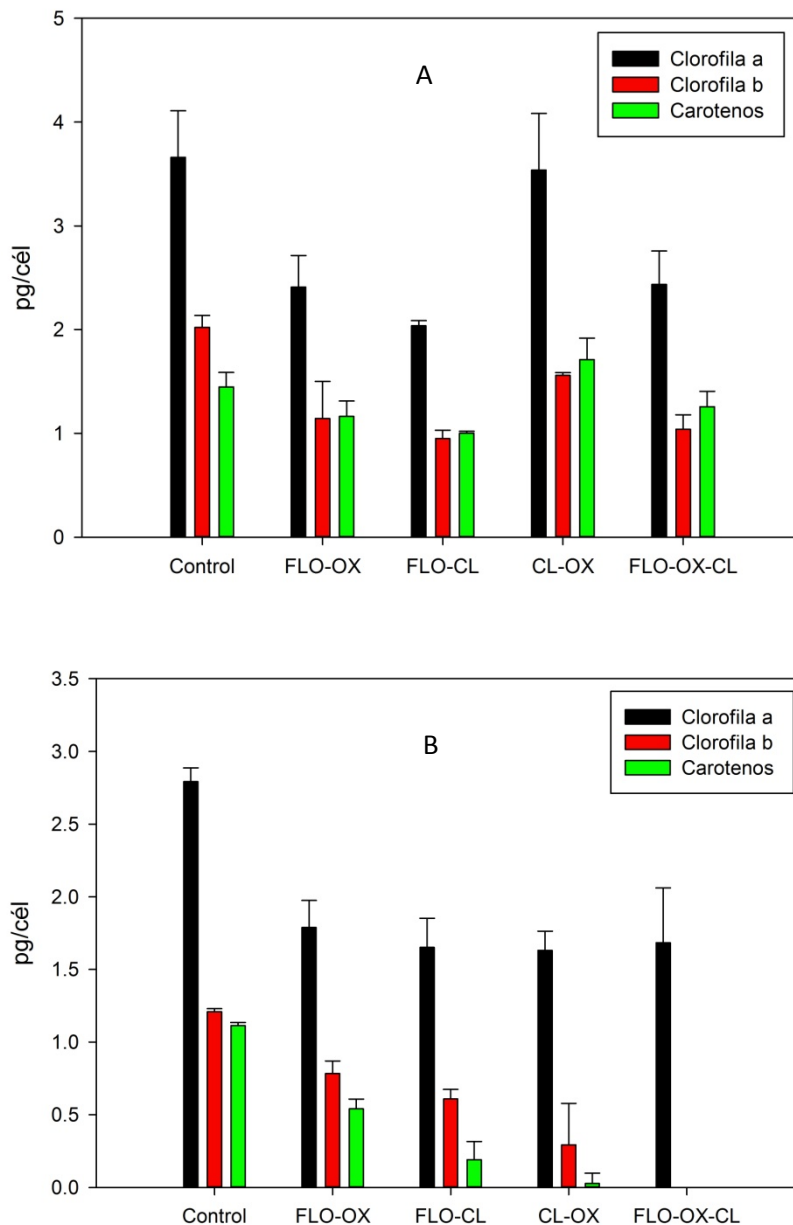


Figura 4. Contenido celular de pigmentos de cada uno de los tratamientos con antibióticos a las 48 horas (A) y a las 96 horas (B). Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar. FLO-OX: floranfenicol y oxitetraciclina; FLO-CL: floranfenicol y cloranfenicol; CL-OX: cloranfenicol y oxitetraciclina; FLO-OX CL: y floranfenicol, cloranfenicol y oxitetraciclina.

Las concentraciones celulares tanto de clorofila a como de clorofila b y carotenoides disminuyen por la exposición de la microalga a los distintos tratamientos con antibióticos; tras 96 horas de exposición el control presenta unos valores de clorofila a de $2,8 \pm 0,095$ pg cél⁻¹ mientras que en el resto de cultivos con antibióticos varía entre $1,63 \pm 0,13$ pg cél⁻¹ y $1,79 \pm 0,18$ pg cél⁻¹; la clorofila b del control presenta un valor de $1,2 \pm 0,021$ pg cél⁻¹, mientras que en el resto de tratamientos con antibióticos varía entre $0,29 \pm 0,28$ pg cél⁻¹ y $0,78 \pm 0,09$ pg cél⁻¹, no pudiéndose determinar en el

tratamiento con los tres antibióticos; los carotenoides del control presentan un valor de $1,1 \pm 0,02$ pg cél⁻¹, mientras que en los diferentes tratamientos con antibióticos varía entre $0,03 \pm 0,07$ pg cél⁻¹ y $0,54 \pm 0,07$ pg cél⁻¹, no pudiéndose determinar en el tratamiento con los tres antibióticos. La causa más probable de esta reducción en el contenido de pigmentos es que estos antibióticos afectan a la síntesis proteica a nivel de las subunidades mayores o menores del ribosoma plastidial, afectando así de forma negativa a la cantidad de pigmentos que contienen las células expuestas a ellos.

Dado que la fotosíntesis es uno de los componentes fundamentales del metabolismo energético de la célula, es importante también estudiar cómo la alteración de este proceso se refleja en otros niveles de la composición bioquímica celular, como puede ser el contenido de proteínas, con el fin de entender los mecanismos celulares de respuesta de *T. suecica* ante estos contaminantes.

4.4 Proteína

Otro parámetro frecuentemente estudiado en los bioensayos de toxicidad de contaminantes en microalgas es el contenido celular en proteínas (Valavanidis et al., 2006).

Aunque el rendimiento de proteína por volumen de cultivo es mayor en los cultivos control que en los cultivos con los distintos tratamientos, el contenido proteico celular presenta menos diferencias significativas; no hay diferencias en los valores celulares de proteína entre el control y los diferentes tratamientos con dos antibióticos, mientras que con la mezcla de los tres antibióticos, el contenido proteico celular es significativamente mayor que en el resto de los cultivos (Fig. 5).

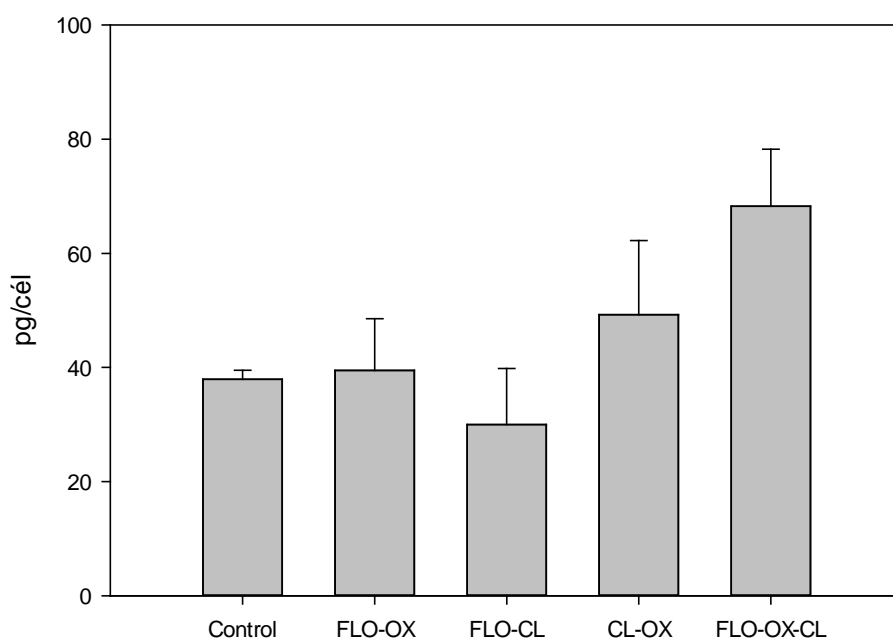


Figura 5. Contenido celular de proteína en el cultivo control y en los distintos tratamientos con antibióticos. Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar. FLO-OX: floranfenicol y oxitetraciclina; FLO-CL: floranfenicol y cloranfenicol; CL-OX: cloranfenicol y oxitetraciclina; FLO-OX CL: y floranfenicol, cloranfenicol y oxitetraciclina.

Estos resultados pueden deberse precisamente a lo citado anteriormente: los antibióticos ensayados actúan a nivel de la síntesis proteica de los ribosomas plastidiales pero no sobre la síntesis proteica de los ribosomas eucariota. Además, este incremento de la proteína celular en los cultivos con la mezcla de los tres antibióticos puede relacionarse con que las células, observadas en el microscopio óptico, mostraban un tamaño mayor que las células del control, debido quizás a que no son capaces de completar el proceso de división. En consecuencia, este mayor tamaño celular determina que las células tengan un mayor contenido de proteínas.

4.2 Actividad celular

La medida de la inhibición enzimática en microalgas es un indicador rápido y sensible de estrés ambiental (Blaise y Ménard, 1998). La actividad esterasa, en particular, ha demostrado ser útil en una gran variedad de células (Breeuwer *et al.*, 1995) y se relaciona con la actividad metabólica celular general (Dorsey *et al.*, 1989; Regel *et al.*, 2002; Regel *et al.*, 2004).

En este estudio, se ha observado un aumento en la actividad metabólica de las células, medida en función de la actividad esterasa, con el paso del tiempo en todos los cultivos, tanto los controles como los tratados con los distintos antibióticos (Fig. 6).

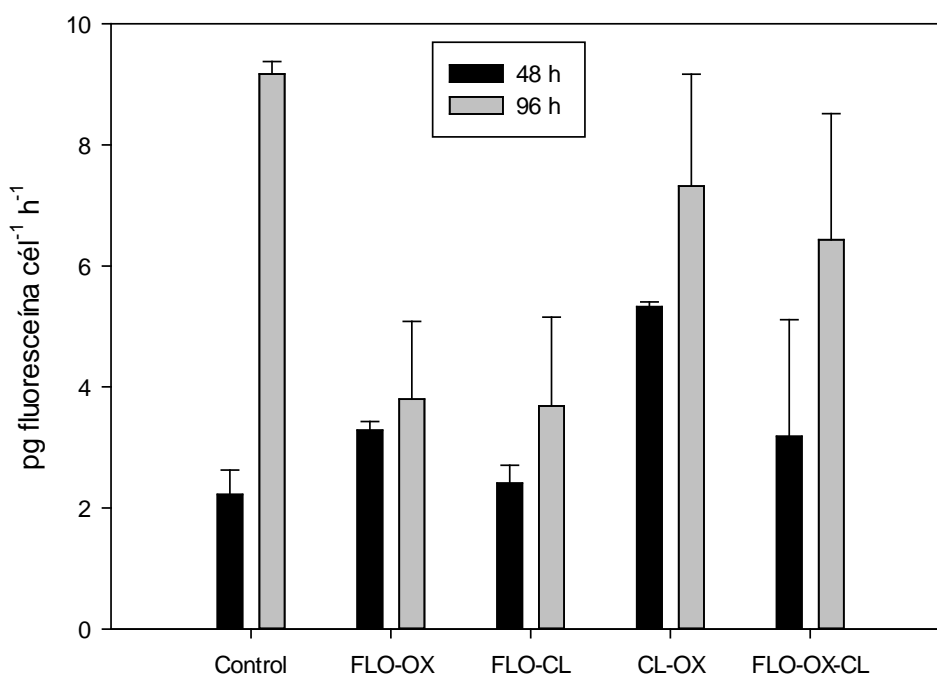


Figura 6. Actividad metabólica celular del cultivo control y de cada uno de los tratamientos con antibióticos a las 48 y a las 96 horas. Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar. FLO-OX: floranfenicol y oxitetraciclina; FLO-CL: floranfenicol y cloranfenicol; CL-OX: cloranfenicol y oxitetraciclina; FLO-OX-CL: y floranfenicol, cloranfenicol y oxitetraciclina.

Los resultados obtenidos muestran que la presencia de las mezclas de antibióticos en el medio tienen un efecto negativo sobre la actividad esterasa. Tras 96 horas de cultivo la actividad esterasa es significativamente mayor en los cultivos control presentando un valor de $9,17 \pm 0,21$ pg fluoresceína cél⁻¹ h⁻¹, que en los cultivos con FLO-OX ($3,8 \pm 1,29$ pg fluoresceína cél⁻¹ h⁻¹) y FLO-CL ($3,69 \pm 1,46$ pg fluoresceína cél⁻¹ h⁻¹), no siendo significativas las diferencias con el resto de los cultivos, CL-OX ($7,32 \pm 1,85$ pg fluoresceína cél⁻¹ h⁻¹) y FLO-OX-CL ($6,43 \pm 2,09$ pg fluoresceína cél⁻¹ h⁻¹).

Sin embargo, este efecto negativo no se observa a las 48 horas, lo que puede ser debido a que las células responden a la situación de estrés provocada por los antibióticos incrementando su actividad, para poder desarrollar algún mecanismo de tolerancia.

5. Conclusiones

1. Las mezclas de antibióticos ensayadas inhiben el crecimiento de la microalga marina *Tetraselmis suecica*. Los valores de inhibición del crecimiento obtenidos con estas mezclas de antibióticos son superiores a valores reportados para el efecto de cada antibiótico por separado, demostrando que existe un efecto sinérgico de estos antibióticos cuando se usan conjuntamente.
2. El contenido celular de pigmentos de *T. suecica* se ha visto alterado negativamente por la presencia de antibióticos en el medio, pudiendo repercutir negativamente en la tasa fotosintética. Este efecto tóxico puede deberse al origen bacteriano de los cloroplastos.
3. El contenido celular de proteínas de *T. suecica* sólo se ha visto incrementado significativamente por la presencia de antibióticos en el medio en el tratamiento que contiene la mezcla de los tres antibióticos. Este efecto puede deberse al mayor tamaño de las células, debido a su incapacidad para completar el proceso de división.
4. La actividad esterasa de *T. suecica* se ha visto alterada negativamente en presencia de antibióticos en el medio tras 96 horas de cultivo; sin embargo, a las 48 horas de cultivo no se observa este efecto negativo debido a que las células pueden estar respondiendo a la situación de estrés generada incrementando su actividad, para poder desarrollar algún mecanismo de tolerancia.

6. Bibliografía

- Arslan-Alaton, I. y Caglayan, A. E., (2006). Toxicity and biodegradability assessment of raw and ozonated procaine penicillin G formulation effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63: 131–140.
- Banni, M., Jebali, J., Daubeze, M., Clerandau, C., Guerbej, H., Narbonne, J. F. y Boussetta, H. (2005). Monitoring pollution in Tunisian coasts: application of a classification scale based on biochemical markers. *Biomarkers* 10: 105-116.
- Blaise, C. y Ménard, L. (1998). A micro-algal solid phase test to assess the toxic potential of freshwater sediments. *Water Qual. Res. J. Can.* 33: 133-151.
- Blanco, M. M., Liébana, P., Gibello, A., Alcalá, C., Fernández-Garayzábal, J. F. y Domínguez, L. (2004). Principales patologías bacterianas en la piscicultura española. REDVET – Revista Electrónica de Veterinaria. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020204.html>. Fecha de consulta: 11/04/2014.
- Breeuwer, P., Drocourt, J. L., Bunschoten, N., Zwietering, M. H., Rombouts, F. M. y Abee, T. (1995). Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1614-1619.
- Butcher, R. W. (1959). An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. Part I. Introduction and *Chlorophyceae*. *Fish In Min Fish Food* 4: 71-74.
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8: 1137–1144.
- Chopra, I. y Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of actions, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 65(2): 232-260.
- Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters* 142 (3): 185-194.
- Couderchet, M. y Vernet, G. (2003). Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55: 271-277.
- Daughton, C.G. y Ternes, T.A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives* 107: 907-938.
- De Orte, M. R., Carballeira, C., Viana, I. G. y Carballeira, A. (2013). Assessing the toxicity of chemical compounds associated with marine land-based fish farms: The use of mini-scale microalgal toxicity test. *Chem. Ecol.* 29(6): 554-563.
- Debelius, B., Forja, J. M., Del Vals, A. y Lubián, L. M. (2008). Effect of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and atrazine on marine microalgae. *Mar. Pollut. Bull.* 57: 559-568.

- Dorsey, J., Yentsch, C. M., Mayo, S. y McKenna, C. (1989). Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae. *Cytometry* 10: 622-628.
- Fábregas, J. (1984). Las microalgas como eslabón de infraestructura en la Microbiología Marina: aislamiento, caracterización, ciclo celular y aprovechamiento tecnológico. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Ferreira, C. S. G., Nunes, B. A., Henriques-Almeida, J. M. M., Guilhermino, L. (2007). Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Ecotox Environ Safe* 67: 452-458.
- Franklin, N. M., Adams, M. S., Stauber, J. L. y Lim, R. P. (2001 a). Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40: 469-480.
- Franklin, N. M., Stauber, J. L. y Lim, R. P. (2001 b). Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 160-170.
- Geoffroy, L., Gilbin, R., Simon, O., Floriani, M., Adam, C., Pradines, C., Cournac, L. y Garnier-Laplace, J. (2007). Effect of selenate on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 83: 149-158.
- Hartmann, A., Alder, A. C., Koller, T. y Widmar, R. M. (1998). Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 377–382.
- Hektoen, H., Berge, J. A., Hormazabal, V. y Yndestad, M. (1995). Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 133: 175–184.
- Hendry, G. A. F. y Price, A. H. (1993). Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. En: *Methods in comparative plant ecology*. Hendry, G. A. F. y Grime, J. P. (Ed.). Chapman & Hall, London. pp. 148-152.
- Hernando, M. D., Mezcua, M., Fernández-Alba, A. R. y Barceló, D. (2006). Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69 (2): 334-342.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Haberer, K. y Kratz, K. L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 225: 109–118.
- Hogan, A. C., Stauber, J. L., Pablo, F., Adams, M. S. y Lim, R. P. (2005). The development of marine toxicity identification evaluation (TIE) procedures using the unicellular alga *Nitzschia closterium*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48: 433-443.
- Jamers, A., Blust, R. y De Coen, W. (2009). Omics in algae: Paving the way for systems biological understanding of algal stress phenomena? *Aquat. Toxicol.* 92: 114-121.
- Jeffrey, S. W. y Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanzen* 167: 191-194.
- Jochem, F. J. (2000). Probing the physiological state of phytoplankton at the single cell level. *Sci Mar* 64: 183-195.

- Kennedy, D. G., Cannavan, A. y McCracken, R. J. (2000). Regulatory problems caused by contamination, a frequently overlooked cause of veterinary drug residues. *J. Chromatogr. A* 882: 37–52.
- Kim, S. y Aga, D. S. (2007). Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. *J. Toxicol. Environ. Health, Part B* 10: 559–573.
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B. y Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sc. Technol.* 36: 1202–1211.
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the environment – a review – Part II. *Chemosphere* 75: 435–441.
- Lai, H. T., Hou, J. H., Su, C. I. y Chen, C. L. (2009). Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis chuii*. *Ecotox Environ Safe* 72: 329-334.
- Lanzky, P. F. y Halling-Sørensen, B. (1997). The toxic effect of the antibiotic metronidazol on aquatic organisms. *Chemosphere* 35: 2553–2561.
- Marconi, R., Lodmell, J. y Hill, W. (1990). Identification of a rRNA/Chloramphenicol interaction site within then peptidyltransferase center of the 50S subunit of the *Escherichia coli* ribosome. *J. Biol. Chem.* 265(14): 7894-7899.
- Maul, J. D., Schuler, L. J., Belden, J. B., Whiles, M. R. y Lydy, M. J. (2006). Effects of the antibiotic ciprofloxacin on stream microbial communities and detritivorous macroinvertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 25: 1598–1606.
- Näslund, J., Hedman, J. E. y Agestrand, C. (2008). Effects of the antibiotic ciprofloxacin on the bacterial community structure and degradation of pyrene in marine sediment. *Aquat. Toxicol.* 90: 223–227.
- Nie, X., Gu, J., Lu, J., Pan, W. y Yang, Y. (2009). Effects or norfloxacin and butylated hydroxyanisole on the freshwater miroalga *Scenedesmus obliquus*. *Ecotoxicology* 18: 677-684.
- Parsons, T. R. y Strickland, J. D. H. (1965). Particulate organic matter. III. I. Pigment analysis. III. II. Determination of phytoplankton pigments. *J. Fish Res. Board Can* 18: 117-127.
- Pereira, J. L., Antunes, S. C., Castro, B. B., Marques, C. R., Gonçalves, A. M. M., Gonçalves, F. y Pereira, R. (2009). Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulations versus active ingredient. *Ecotoxicology* 18: 455-463.
- Pratt, W. (1981). *Quimioterapia de la infección*. Ed. Oxford University Press. New York. USA. 431 pp.
- Regel, R. H., Ferris, J. M., Ganf, G. G. y Brookes, J. D. (2002). Algal esterase activity as a biomeasure of environmental degradation in a freshwater creek. *Aquat. Toxicol.* 59: 209-223.
- Regel, R. H., Brookes, J. D., Ganf, G. G. y Griffiths, R. W. (2004). The influence of experimentally generated turbulence on the Mash01 unicellular *Microcystis aeruginosa* strain. *Hydrobiologia* 517: 107-120.
- Rodea-Palomares, I., Petre, A. L., Boltes, K., Leganés, F., Perdígón- Melón, J. A., Rosal, R. y Fernández-Piñas, F. (2010). Application of the combination

index (CI)-isobologram equation to study the toxicological interactions of lipid regulators in two aquatic bioluminescent organisms. *Water Research* 44 (2): 427-438.

- Shao, Z.J., (2001). Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50: 229–243.
- Seoane, M. (2014). Citotoxicidad ejercida por tres antibióticos utilizados en acuicultura en la microalga marina *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. Trabajo Fin de Máster. Máster en Acuicultura. Universidade da Coruña.
- Strom, D., Ralph, P. J. y Strauber, J. L. (2009). Development of a toxicity identification evaluation protocol using chlorophyll-a fluorescence in a marine microalga. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 30-38.
- Teuschler, L. K. (2007). Deciding which chemical mixtures risk assessment methods work best for what mixtures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 223 (2): 139-147.
- Uriarte, I., Farias, A. y Castilla, J. C. (2001). Effect of antibiotic treatment during larval development of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquac. Eng.* 25: 139–147.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M. y Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64: 178-189.
- Van Wezel, A. P. y van Vlaardingen, p. (2004). Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquat. Toxicol.* 66: 427-444.
- Ye, Z., Weinberg, H. S. y Meyer, M. T. (2007). Trace analysis of trimethoprim and sulphonamide, macrolide, quinolone, and tetracycline antibiotics in chlorinated drinking water using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 79, 1135–1144.
- Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M. y Fanelli, R. (2000). Presence of therapeutic drugs in the environment. *The Lancet* 355: 1789-1790.