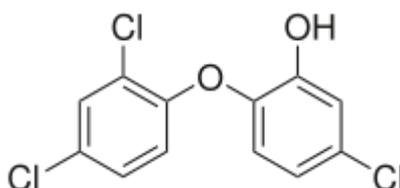


Acumulación y transferencia de contaminantes emergentes en una cadena trófica

Emerging contaminants accumulation and transfer in a trophic chain

Acumulación e transferencia de contaminantes emerxentes nunha cadea trofica



Máster interuniversitario gallego en Acuicultura
[Universidade da Coruña](http://www.udc.es)

Alumna:
Marina García Gutiérrez

Tutoras:
Ángeles Cid
Concepción Herrero

Índice

Resumen	3
Abstract	3
Resumo	3
1. Introducción	4
2. Objetivo	5
3. Material y métodos	5
3.1 Microalga	5
3.2 Rotífero	6
3.3 Contaminantes	7
3.4 Diseño experimental	8
3.5 Análisis de los contaminantes	9
3.6 Análisis estadístico	10
4. Resultados	10
4.1 Bisfenol- A	10
4.2 Triclosán	14
4.3 Diferencia entre contaminantes	18
5. Conclusiones	19
6. Bibliografía	20

Resumen

Este estudio trata de investigar la potencial bioacumulación y transferencia de dos contaminantes emergentes, bisfenol- A (un retardante de llama) y triclosán (bactericida) a través de dos componentes del plancton, constituyentes de una cadena trófica (microalga *Tetraselmis suecica* y rotífero *Brachionus plicatilis*). Para ello se analizaron diferentes parámetros: crecimiento poblacional y cantidad de hembras ovadas y huevos por mililitro. Los resultados muestran una alteración significativa de estos parámetros respecto a los controles, evidenciando que el triclosán afecta en mayor grado que el bisfenol-A, y que la exposición a través del medio acuático, produce una mayor bioacumulación de contaminante en el rotífero, que a través del alimento.

Abstract

This study tries to research the potential bioaccumulation and transfer of two emerging pollutants, bisphenol-A (a flame retardant) and triclosan (bactericide) through two components of the plankton, constituents of a trophic chain (microalga *Tetraselmis suecica* and rotifer *Brachionus plicatilis*). To do this, different parameters were analyzed: population growth and number of ovate females and eggs per milliliter. The results show a significant alteration of these parameters with respect to the controls, showing that triclosan affects to a greater degree than bisphenol-A, and that the exposure through the aquatic environment, produces a greater bioaccumulation of contaminant in the rotifer, than through food.

Resumo

Este estudo trata de investigar a potencial bioacumulación e transferencia de dous contaminantes emerxentes, bisfenol- A (un retardante de chama) e triclosán (unha sustancia bactericida) a través de dous compoñentes do plancto, constituíntes dunha cadea trófica (a microalga *Tetraselmis suecica* e o rotífero *Brachionus plicatilis*). Para iso analizáronse diferentes parámetros: crecemento poboacional e cantidade de femias con ovos e número de ovos por mililitro. Os resultados mostran unha alteración significativa destes parámetros respecto dos controis, evidenciando que o triclosán afecta en maior grao que o bisfenol-A, e que a exposición a través do medio acuático, produce unha maior bioacumulación de contaminante no rotífero, que a través do alimento.

1. Introducción

En los últimos años, el desarrollo de nuevos y más sensibles métodos de análisis ha permitido alertar de la presencia de contaminantes emergentes en aguas.

Los contaminantes emergentes son compuestos cuyo vertido puede suponer un problema sanitario y ambiental que aún no está suficientemente investigado ni regulado. Son contaminantes no necesariamente persistentes, pero solubles en agua por lo que son capaces de penetrar en todas las etapas del ciclo del agua.

Los estudios muestran que la biota acuática, su estado general de salud y bienestar está sufriendo debido a la contaminación del océano. Esto significa que a pesar de que muchas formas de vida marina sobreviven, su variabilidad genética y sus métodos globales de supervivencia se reducen. Estos contaminantes afectan no solo por su mera presencia en el medio acuático sino a través de la cadena trófica, lo que supone una reacción en cadena desde los seres vivos más pequeños (como el plancton) hasta los grandes habitantes como los mamíferos marinos.

La principal fuente de entrada de estos compuestos en el medio ambiente acuático son las aguas residuales, aunque también cabe destacar el papel de la agricultura y ganadería como fuentes de contaminación difusa de pesticidas y antibióticos, respectivamente. Actualmente, la Directiva 2013/39/UE es la que regula las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. Esta directiva modifica la DMA (Directiva Marco del Agua 2000/60/EC) y la EQSD (Environmental Quality Standards Directive) en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y amplía la lista hasta 45 sustancias prioritarias, de las cuales 21 son identificadas como peligrosas.

Algunos de estos contaminantes son:

- Pesticidas o plaguicidas
- Fármacos
- Productos de higiene personal (PCP, Personal Care Products) como perfumes, protectores solares y repelentes de insectos
- Antisépticos como triclosán o el clorofeno
- Retardantes de llama como el difenil éteres policromados (PBDEs), tetrabromo, bisfenol A, tris (2-cloroetil) fosfato
- Drogas ilegales como la cocaína, cannabinoides o las anfetaminas
- Subproductos de desinfección como bromoácidos, bromhaldeídos o los bromatos
- Aditivos de gasolina como el dialquil éteres, metil-t-butil éter (MTBE)

En la mayoría de los casos su eliminación en las estaciones depuradoras de agua residual convencionales no es completa. Actualmente existen nuevas tecnologías de mayor eficacia para su eliminación, desde las más conocidas como son los biorreactores de membrana a otras de mayor coste como la osmosis reversa, la micro-filtración o los

procesos de oxidación avanzada. Sin embargo, la aplicación de este tipo de tecnologías supone un alto coste en el tratamiento del agua que aún pocas empresas gestoras de servicios del agua están dispuestas a asumir. En ocasiones, con estas tecnologías no se alcanza una mineralización completa del contaminante. En consecuencia, se pueden acumular al final del proceso productos de transformación persistentes que en algunos casos pueden ser más perjudiciales que los compuestos de partida.

2. *Objetivo*

El objetivo de este estudio es comprobar si dos contaminantes emergentes, como son el bisfenol A y el triclosán cuyas propiedades y efectos no han sido estudiados a largo plazo ni en muchos escenarios biológicos, se transfieren a través de la cadena trófica o son bioacumulados. Para ello, se ha utilizado una cadena trófica mínima, microscópica, consistente en una microalga marina, *Tetraselmis suecica*, y el rotífero *Brachionus plicatilis*.

3. *Material y métodos*

3.1 *Microalga*

Tetraselmis suecica es una prasinofícea eurihalina de la familia *Chlorodendraceae* (Guiry, 2018) (Figura 1), una microalga verde marina, con un peso aproximado de 200 picogramos (FAO 2017), móvil, con dos flagelos, habitualmente empleada tanto para estudios de laboratorio como acuariofilia “amateur” por su facilidad de cultivo y alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Fábregas et al., 2011) y acumulación de almidón en el interior de su cloroplasto. Tiene clorofilas a y b, y α y β carotenos.



La cepa microalgal utilizada en el presente trabajo fue aislada de las aguas de la Ría de Arousa (Fábregas, 1982) y mantenida en laboratorio en las condiciones que se describen más adelante.

Figura 1: *Tetraselmis suecica* (Fuente: <http://seahorsebreeder.co.uk>)

3.2 Rotífero

Brachionus plicatilis (Figura 2) (O. F. Müller) (conocido como L type) pertenece a la clase *Monogononta* del filum *Rotifera*, ubicándose dentro del orden *Ploima* y familia *Brachionidae* (Ruttner-Kolisko, 1974). La cepa de esta especie de rotífero, utilizada en este trabajo fue cedida por el Acuario Finisterrae (A Coruña).

Los rotíferos son animales eutélicos microfiltradores, de 125 a 300 μm de longitud, que se encuentran en la columna de agua nadando y filtrando protozoos, bacterias, microalgas y todas las pequeñas partículas susceptibles de ser utilizadas como alimento. En cuanto a su distribución geográfica, los rotíferos son organismos que pueden vivir en distintos hábitats: lagos, charcas y agua de mar, soportando amplias variaciones de salinidad y temperatura (Coll, 1983). Los rotíferos son pseudocelomados no segmentados que en el extremo anterior tienen una faringe ciliada o corona. Poseen un tubo digestivo completo con boca en la región anterior, una faringe muy diferenciada provista de piezas móviles que actúan como mandíbulas, llamada mastax, y una cloaca posterior. El cuerpo está dividido en cabeza, tronco y región posterior, llamada pie. La parte de la cabeza desprovista de cilios se llama región apical y está rodeada por la corona ciliada (Meglitsch, 1972).



Figura 2: *Brachionus plicatilis*
(Fuente:
<http://micro.magnet.fsu.edu/>)

Los cilios de la corona en los márgenes anterior y posterior de la región ciliada son mayores, constituyendo dos pequeños círculos especiales: uno anterior o troco y otro posterior o cingulo. Los protozoos, las bacterias y las microalgas son conducidas a la boca por los cilios.

Los rotíferos se mueven reptando o nadando. La propulsión natatoria depende de los cilios de la corona, mientras que los movimientos reptantes son efectuados por el pie (Barnes, 1989).

Los rotíferos monogonontes, al que pertenece *B. plicatilis*, se reproducen muy a menudo por vía partenogenética (reproducción amíctica). Este ciclo ameiótico puede interrumpirse por fases de reproducción sexual (reproducción mítica) desencadenadas por ciertos factores de origen exógeno (temperatura, nutrición, densidad de población...) o endógeno (edad) (Pourriot, 1991). Las hembras sexuales, llamadas

míticas ya que sus huevos experimentan una meiosis, producen en ausencia de fecundación machos de pequeño tamaño. Estos últimos tienen una cáscara gruesa y adornada; su eclosión se retarda (diapausa) asegurando de este modo la supervivencia de la especie cuando se dan condiciones desfavorables (deseccación, frío, escasez de alimento...). De este tipo de huevos nace siempre una hembra amítica que es origen de un nuevo ciclo. Es probable que la partenogenia y la presencia de dos tipos de huevos sean adaptaciones para la vida en agua dulce, sobre todo en lagunas y arroyos estacionales. Los huevos latentes soportan condiciones ambientales adversas como deshidratación y temperaturas extremas y la partenogénesis facilita el rápido incremento de la población.

3.3 Contaminantes

3.3.1 Bisfenol A

El BPA o 4,4'-(propano-2,2-diil) difenol es un monómero catalogado como disruptor endocrino empleado principalmente en la fabricación de plásticos.

Conocido como BPA por sus siglas en inglés (2,2-(4,4-dihidroxidifenil) propano), se deriva de la combinación de dos moles de fenol y un mol de acetona. Más del 99% de la producción de BPA es usado en la producción de policarbonato y resinas epóxicas. Como producto final se encuentran en los adhesivos, revestimientos, lentes ópticos, pinturas en polvo y demás productos (Staples, 1998). Por otra parte, desde que ha mostrado propiedades estrogénicas, se ha descrito como un disruptor químico endocrino (García et al. 2011) teniendo la capacidad de activar o bloquear la actividad de los receptores de estrógenos en humanos; también interactúa con otros receptores como de la hormona tiroides y ha sido catalogado como sustancia que afecta la fertilidad (Geens et al. 2012). Solamente en 2003 Estados Unidos produjo una tercera parte de BPA a nivel mundial y para 2011, el consumo predicho superó los 5,5 millones de toneladas métricas a nivel global (Flint et al. 2012).

El BPA usado en este trabajo presenta pureza igual a 99% y es comercializado por Sigma-Aldrich.

La concentración de bisfenol A utilizada en este estudio ha sido 2,5 mg/L, que se corresponde con la concentración efectiva que reduce en un 50% el crecimiento de la microalga *Tetraselmis suecica* a las 96 horas de exposición (datos no publicados).

3.3.2 Triclosán

El triclosán o 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol, es un antiséptico ampliamente utilizado en productos de consumo como desodorantes o colutorios, además de productos hospitalarios.

Este agente antimicrobiano ha sido utilizado durante más de 40 años como desinfectante o conservante en entornos clínicos tiene un amplio rango de actividad contra bacterias, Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, etc. También ha demostrado ser ecotóxico, particularmente para las algas en entornos acuáticos

(Tatarazako et al. 2004) (Seoane et al., 2017). Además, interfiere con el ciclo del nitrógeno en los sistemas naturales (Fernandes et al. 2008, Waller and Kookana 2009). Es un bacteriostático a bajas concentraciones, pero a niveles altos es un bactericida que actúa a través de múltiples mecanismos incluyendo el daño de membrana (Gilbert and McBain 2002), y que en concentraciones subletales, actúa inhibiendo la actividad de una enzima crítica en la biosíntesis de ácidos grasos bacterianos (Heath et al. 2002, Zhang et al. 2004). El triclosán usado en este trabajo presenta pureza igual a 99% y es comercializado por Sigma-Aldrich.

La concentración de triclosán utilizada en este estudio ha sido 0,4 mg/L, que se corresponde con la concentración efectiva que reduce en un 50% el crecimiento de la microalga *Tetraselmis suecica* a las 96 horas de exposición (Seoane et al., 2017).

3.4 Diseño experimental

Este estudio se ha realizado en 2 etapas. Una primera etapa en la que se llevan a cabo cultivos de microalgas que se exponen durante 24 horas a cada uno de los contaminantes ensayados. Después de las 24 horas de exposición, la biomasa microalgal se recoge por centrifugación para ser utilizada posteriormente en el cultivo de los rotíferos. El cultivo de rotíferos constituye la segunda etapa de este diseño experimental.

Tetraselmis suecica se cultiva en medio Algal-1, a una temperatura estable en cámara de $18^{\circ}\pm 1$, y con agua de mar esterilizada en autoclave (120°C , 20'), y con ciclos de luz:oscuridad 12:12h.

Se tenían en la cámara 2 botellones de 2L cada uno, uno de stock (microalga control, sin exposición al contaminante, que serviría de alimento al control de rotíferos y a las réplicas expuestas a través del agua) y otro expuesto al contaminante del experimento durante 24h, para después centrifugar la biomasa y utilizar el pellet de microalga durante el experimento, como alimento. Diariamente se ajusta la densidad celular necesaria para el cultivo de rotífero a partir de la biomasa congelada, y es ajustada la ración en función de la cantidad de rotífero/mililitro que hubiera en cada réplica, sabiendo que cada rotífero consume como máximo 15000 células al día (Rioboo et al., 2007).

Para el experimento completo se han empleado 9 réplicas de 200 mL en cada ensayo con igual densidad de rotíferos inicial (5 individuos/mL) para ser alimentados con microalga control, no expuesta a ningún contaminante (3 réplicas de control y 3 de rotíferos expuestos a través del agua), y otros alimentados con microalga expuesta durante 24 horas a un contaminante.

La dosis diaria de alimentación es de 15000 células por rotífero (equivalencia en peso y ración con la administrada de *Chlorella*, (Rioboo et al., 2007)).

Diariamente se recuentan los rotíferos: individuos vivos, hembras ovadas y huevos por mililitro.

Todas las réplicas, permanecían en igualdad de condiciones de luz, temperatura ($21\pm 1^\circ\text{C}$) y aireación permanente.

Al terminar cada ensayo de contaminante, la biomasa de rotífero era congelada para su posterior análisis por el Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI).

3.5 Análisis de los contaminantes

Una vez finalizado el experimento, los rotíferos de cada réplica fueron congelados y enviados a los SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación de la UDC) donde las muestras fueron liofilizadas y extraídas con metanol, y mantenidas a -20°C hasta su análisis. La determinación se llevó a cabo mediante la técnica cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a un espectrómetro de masas (modelo LTQ Orbitrap Discovery)

Ésta técnica es químico-analítica y combina la separación física de los distintos componentes por adsorción selectiva con la determinación de la distribución de las moléculas de una muestra en función de su masa. La cromatografía líquida consta de dos fases, una estacionaria o fija, donde algunos componentes de la muestra serán retenidos por afinidad electrostática en función de su carga/tamaño y otra móvil que fluye constantemente durante el análisis y está constituida generalmente por un líquido que arrastra los componentes de menos afinidad a través de la columna.

El espectrómetro de masas, separa los núcleos atómicos en función de su relación entre masa y carga, mediante el calentamiento de un haz de material de la muestra, hasta vaporizarlo e ionizar los diferentes átomos. Este haz de iones, produce un patrón específico en el detector, identificable.

Las condiciones analíticas para el bisfenol A fueron:

Columna: Phenomenex Kinetex Bifenilo $2.6\mu\text{m}$, $100\text{ mm} \times 2.1\mu\text{m}$.

Elución: En gradiente. A = AGUA + 0.1% amoníaco. B = metanol + 0.1% amoníaco. T = 45°C . Volumen de inyección $20\mu\text{L}$. Flujo 0.25 mL/min .

Detección: Mediante espectrometría de masas de alta resolución. Ionización ESI-. $R > 30000$

Las condiciones analíticas para el triclosán fueron:

Columna: Phenomenex Kinetex Bifenilo $2.6\mu\text{m}$, $100\text{ mm} \times 2.1\mu\text{m}$.

Elución: En gradiente. A = AGUA + 0.1% ácido formico. B = metanol + 0.1% ácido formico. T = 45°C . Volumen de inyección $20\mu\text{L}$. Flujo 0.25 mL/min .

Detección: Mediante espectrometría de masas de alta resolución. Ionización ESI-.
R>30000

3.6 Análisis estadístico

Los valores medios de cada uno de los resultados fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA (análisis de la varianza de un factor) para saber si existen diferencias significativas entre los tratamientos y los cultivos control. El análisis se realizó con el paquete estadístico Microsoft Excel.

4. Resultados

4.1 Bisfenol- A

Crecimiento

El crecimiento de los rotíferos se ve afectada significativamente ($p < 0,05$) por la concentración de bisfenol A ensayada (Figura 3).

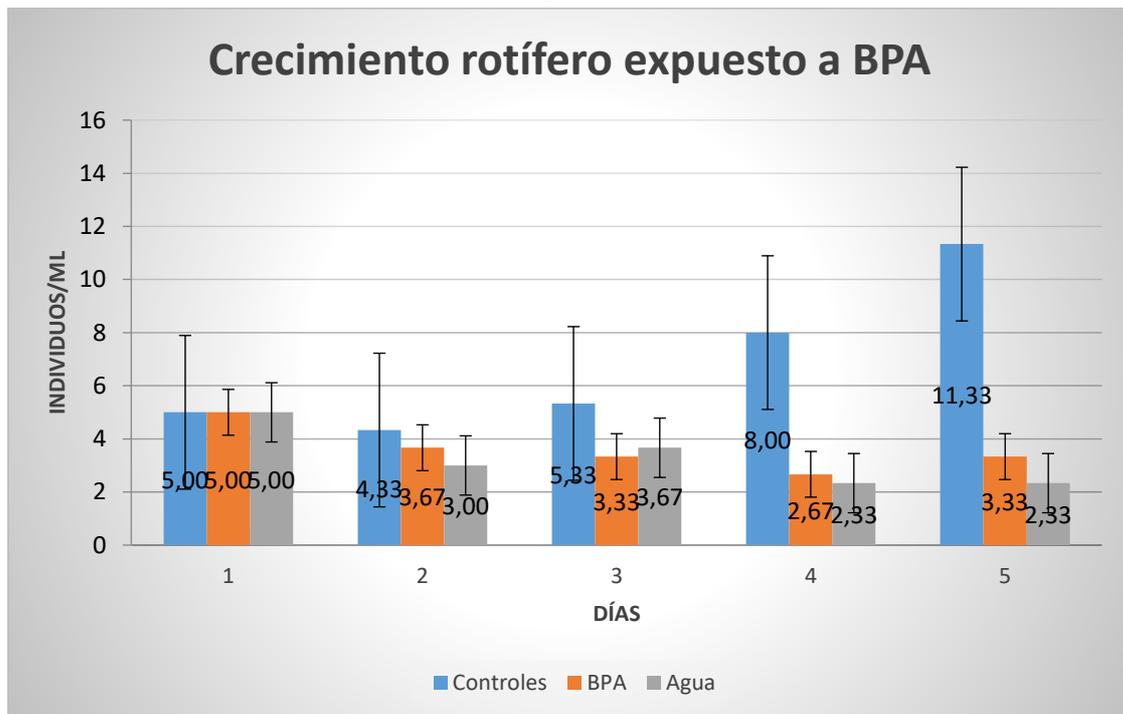


Figura 3: Cantidad de individuos vivos por mililitro durante los días de estudio. Se muestran las medias de los valores de crecimiento obtenidos en las réplicas de control, las réplicas expuestas a bisfenol-A a través de las microalgas (BPA) y las réplicas expuestas a través del medio (Agua).

A partir del tercer día de exposición se percibe una mayor diferencia en la cantidad de individuos vivos por mililitro, llegando a ser más del doble en el control al quinto día, respecto a los expuestos al contaminante. Durante los 5 días del experimento, se observó un crecimiento de más del doble en controles (una media de 11,33 individuos

al quinto día frente a los 5 iniciales), mientras que, en las réplicas expuestas, el número de individuos disminuyó (Llegando a mínimos medios de 2 y 3 individuos por mililitro para las réplicas expuestas).

Hembras ovadas

La cantidad de hembras ovadas por mililitro se ve afectada significativamente ($p < 0,05$) por la concentración de bisfenol-A ensayada (Figura 4).

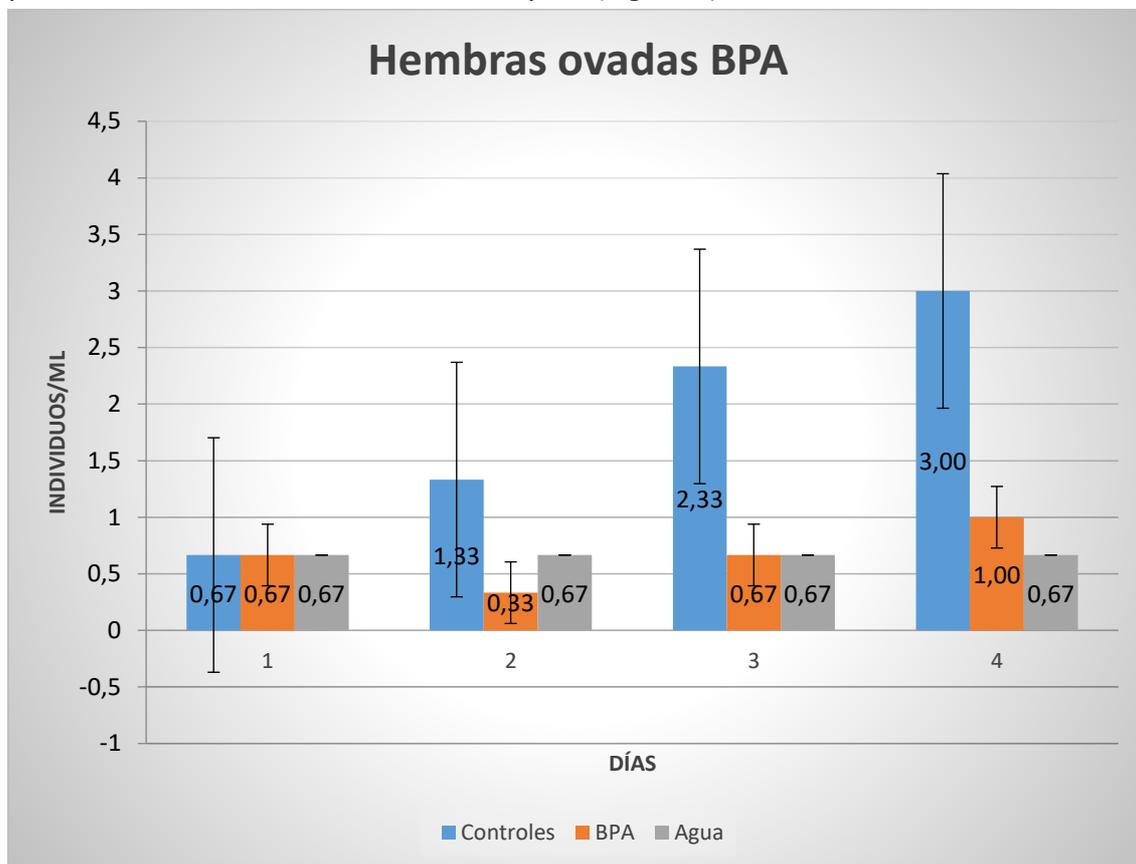


Figura 4: Hembras ovadas por mililitro en el ensayo. Se muestran las medias de los valores de hembras ovadas obtenidos en las réplicas de control, las réplicas expuestas a bisfenol-A a través de las microalgas (BPA) y las réplicas expuestas a través del medio (Agua).

La cantidad de hembras ovadas (Figura 4), aunque partía del mismo valor (menos de una por mililitro tras el primer día expuestos), permitió ver diferencias en los dos últimos días del estudio, presentando una media de hasta 3 hembras con huevos en los controles, y una media de una o menos en los expuestos a través de la alimentación y el agua. Los rotíferos expuestos a través del agua prácticamente no tuvieron cambios respecto al primer día, no se produjo desarrollo de la población, ni aumentaron la cantidad de hembras ovadas por mililitro.

Huevos

La cantidad de huevos por mililitro no se ve afectada significativamente ($p > 0,05$) por la concentración de bisfenol-A ensayada (Figura 5).

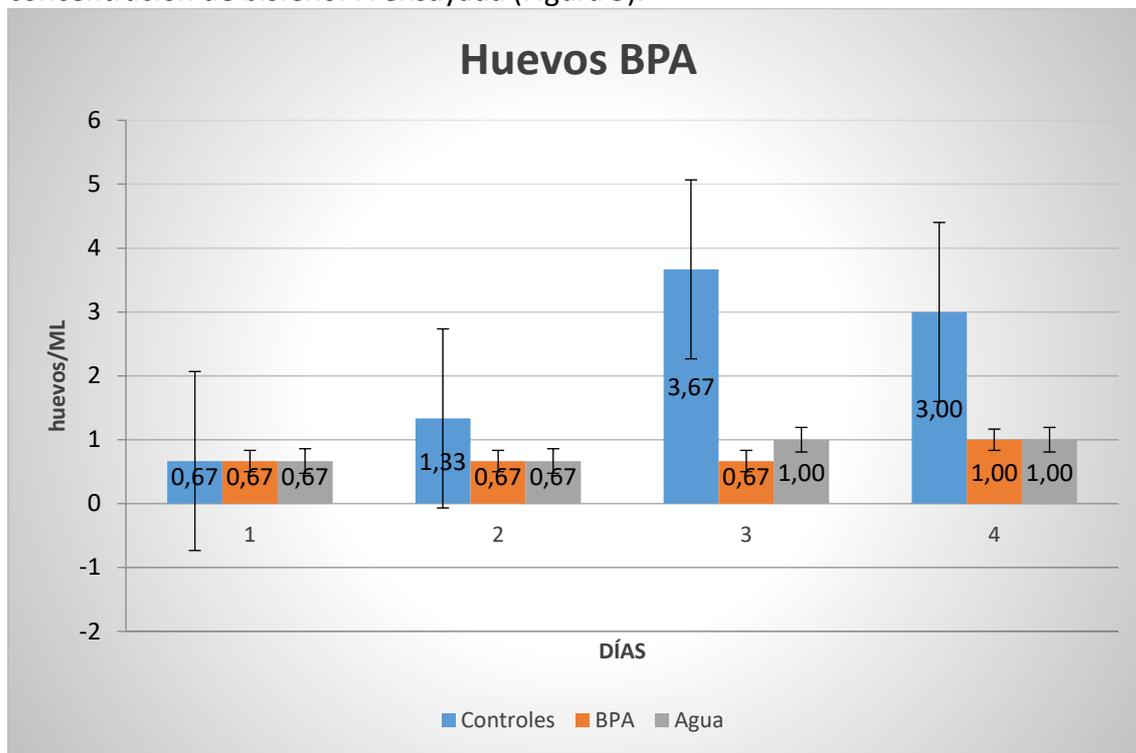


Figura 5: Cantidad de huevos por mililitro durante los días de estudio. Se muestran las medias de los valores de huevos por mililitro obtenidos en las réplicas de control, las réplicas expuestas a bisfenol-A a través de las microalgas (BPA) y las réplicas expuestas a través del medio (Agua).

La cantidad de huevos (Figura 5) por mililitro en los 4 días de recuento del experimento muestra una lenta evolución, sin aumentar la cantidad de huevos por mililitro los dos primeros días. Al contrario, el último día había una media de hasta 3 huevos por mililitro analizado en los controles, mientras que, en los expuestos a bisfenol-A a través de la alimentación, encontramos sólo una o dos hembras ovadas, con sólo uno o dos huevos por mililitro; y en los expuestos a través del medio una o ninguna hembra, con pocos o ningún huevo.

Niveles del contaminante en biomasa

Los valores de bisfenol obtenidos en la biomasa de rotíferos se ven afectados significativamente ($p < 0,05$) entre las muestras control y las expuestas (Figura 6).

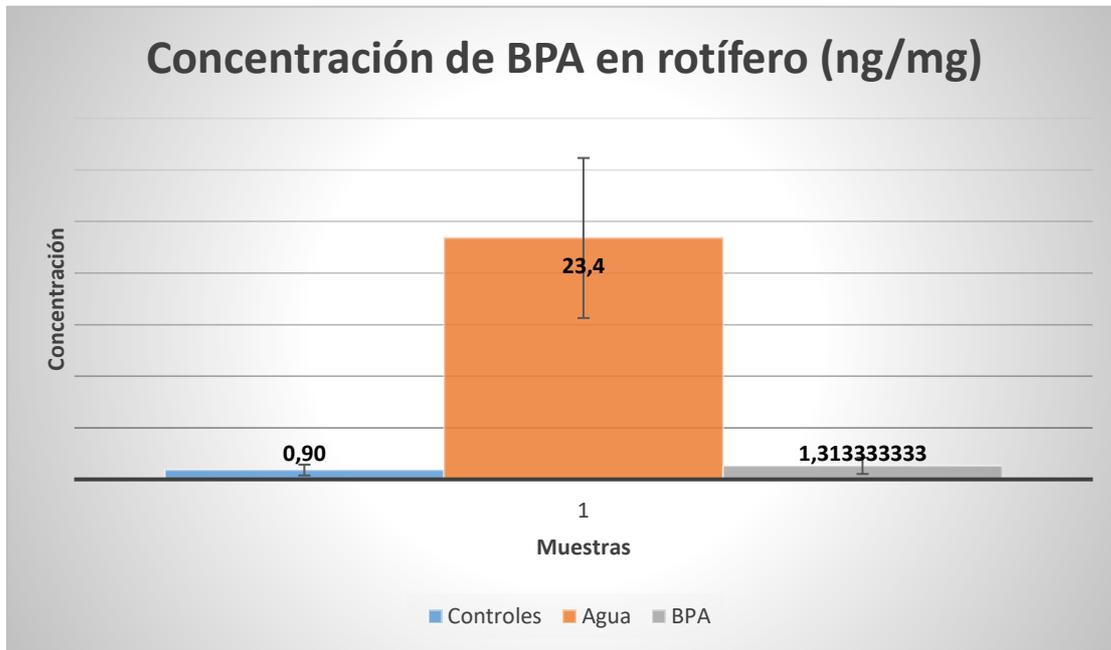


Figura 6: Concentración de bisfenol A en la biomasa. Se muestran las medias de los valores de contaminante obtenidos en las réplicas de control, las réplicas expuestas a bisfenol-A a través de las microalgas (BPA) y las réplicas expuestas a través del medio (Agua).

Los resultados del laboratorio (Figura 6) muestran que la bioacumulación y transferencia del contaminante es de hasta 23,4 nanogramos de contaminante por miligramo de biomasa en el caso de las réplicas expuestas a través del agua, en cambio la absorción a través de la cadena trófica, es menor, con un valor de 1,313 nanogramos por miligramo de biomasa. En los controles que debiera ser 0, se han obtenido valores medios de 0,9 ng/mg, lo que indica una contaminación en alguna de las réplicas.

4.2 Triclosán

Crecimiento

El crecimiento se ve afectado significativamente ($p < 0,05$) por la concentración de triclosán ensayada (Figura 7).

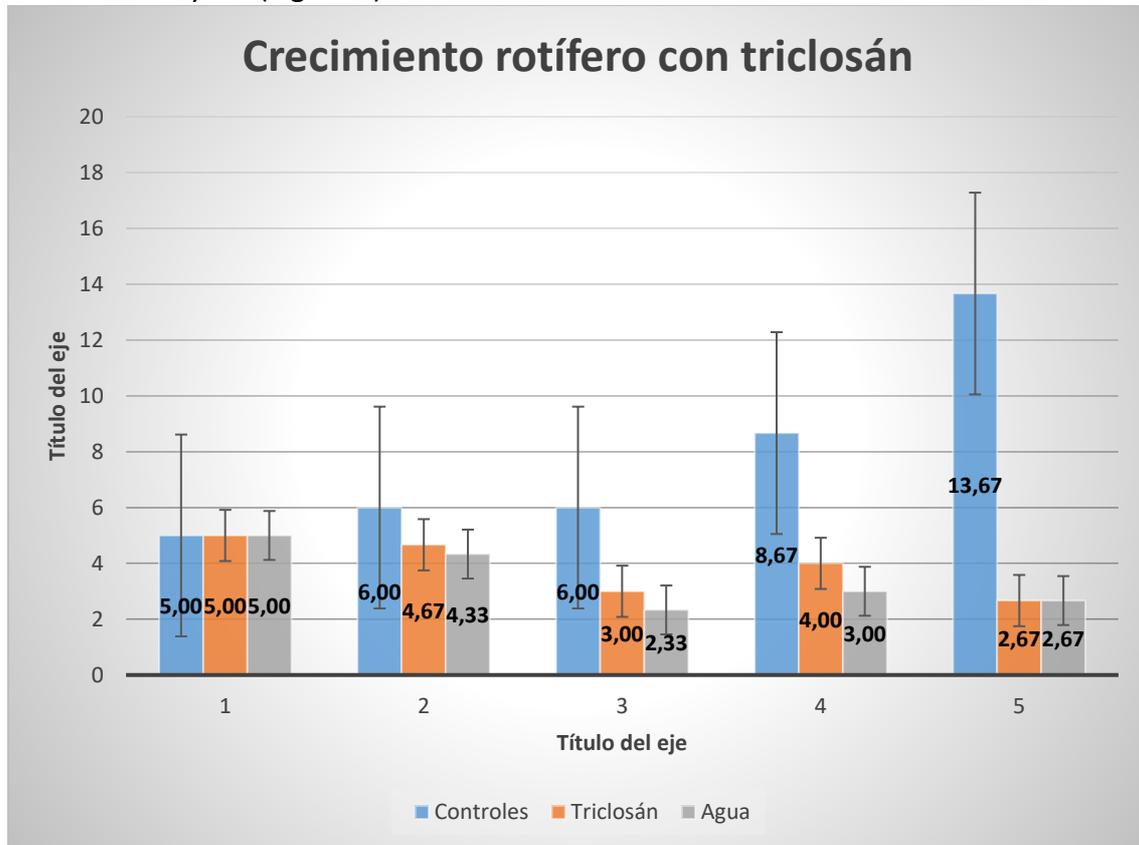


Figura 7: Valores de crecimiento de individuos durante los días de estudio. Se muestran las medias de los valores individuos obtenidos en las réplicas de control, las réplicas expuestas a triclosán a través de las microalgas (Triclosán) y las réplicas expuestas a través del medio (Agua).

En la figura 7 se ven los resultados obtenidos de supervivencia en el experimento con triclosán. El número de individuos vivos por mililitro a lo largo del estudio, en el quinto día muestra valores de casi el triple respecto al primer día en los controles (una media de casi 14 individuos por mililitro analizado, mientras que inicialmente eran 5). Por el contrario, en las réplicas expuestas a triclosán a través de la cadena trófica y del medio, no se logra crecimiento ningún día, en cambio si se observa un descenso en los individuos vivos por mililitro, llegando a valores medios inferiores a los 3 individuos por mililitro analizado, el último día.

Hembras ovadas

La cantidad de hembras ovadas por mililitro se ve afectada significativamente ($p < 0,05$) por la concentración de triclosán ensayada (Figura 8).

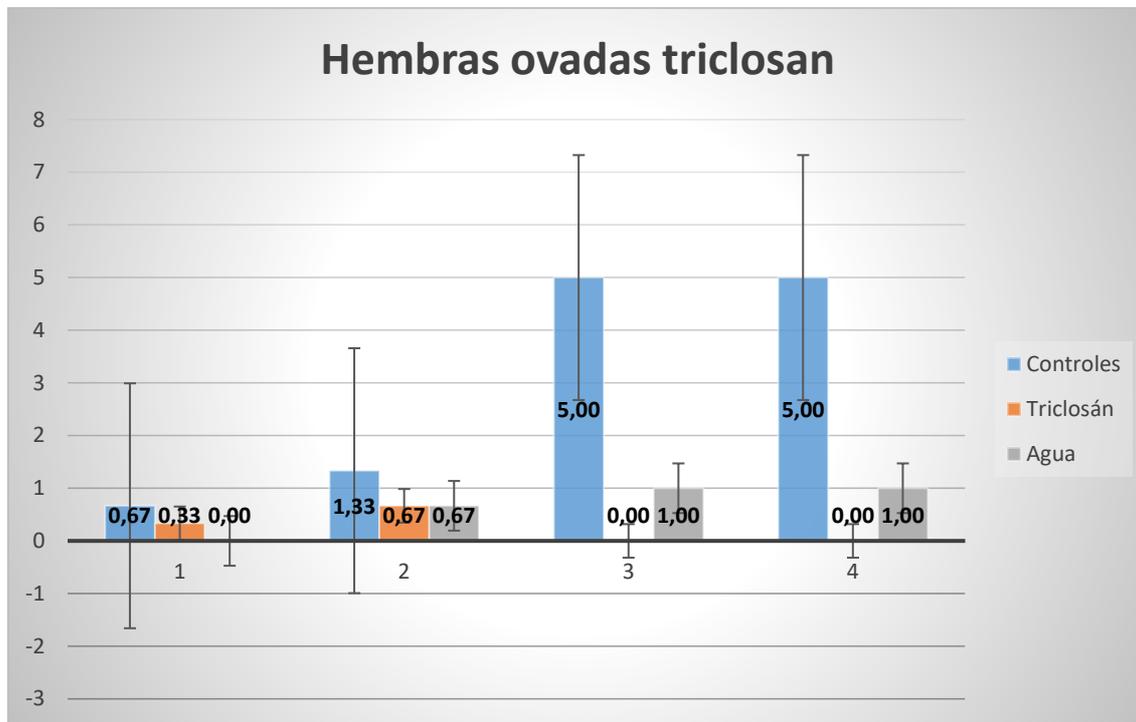


Figura 8: Cantidad de hembras ovadas/mililitro analizado. Se muestran las medias de los valores individuos obtenidos en las réplicas de control, las réplicas expuestas a triclosán a través de las microalgas (Triclosán) y las réplicas expuestas a través del medio (Agua).

Con el triclosán, los valores muestran una afectación evidente en la fertilidad (Figura 8), dado que las medias obtenidas en los controles, de hasta 5 hembras ovadas por mililitro en el último día de ensayo, al contrario que todas las réplicas expuestas, cuyos valores medios son de 1 hembra ovada en el caso de los expuestos a través del agua o ninguna en los expuestos a través de la alimentación.

Huevos

La cantidad de huevos por mililitro sí se ve afectada significativamente ($p < 0,05$) por la concentración de bisfenol-A ensayada (Figura 4).

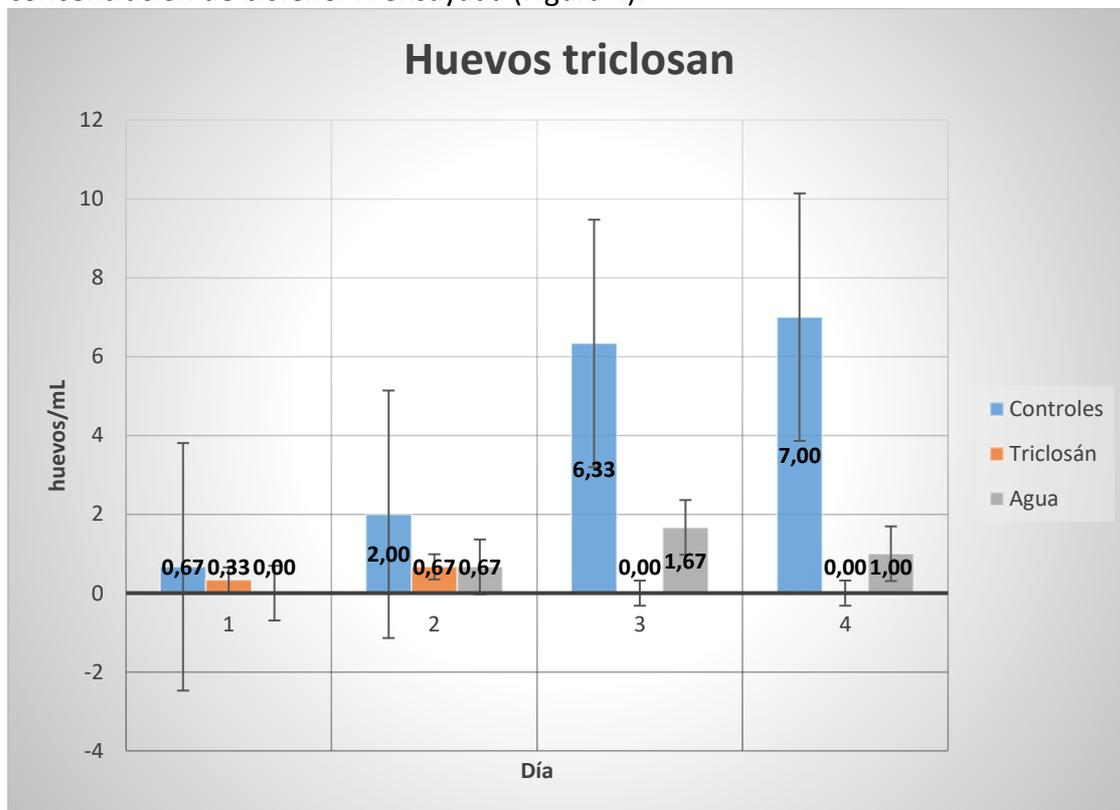


Figura 9: Cantidad de huevos/mililitro analizado. Se muestran las medias de los valores individuales obtenidos en las réplicas de control, las réplicas expuestas a triclosán a través de las microalgas (Triclosán) y las réplicas expuestas a través del medio (Agua).

El triclosán parece tener efectos nocivos sobre los huevos viables por mililitro, encontrando en las réplicas expuestas prácticamente la inexistencia de huevos con valores medios inferiores a 1, mientras que en los controles se llegan a alcanzar los 7 huevos por mililitro el último día (Figura 9).

Niveles de contaminante en biomasa

Los valores de triclosán obtenidos en la biomasa de rotíferos se ven afectados significativamente ($p < 0,05$) entre las muestras control y las expuestas (Figura 10).

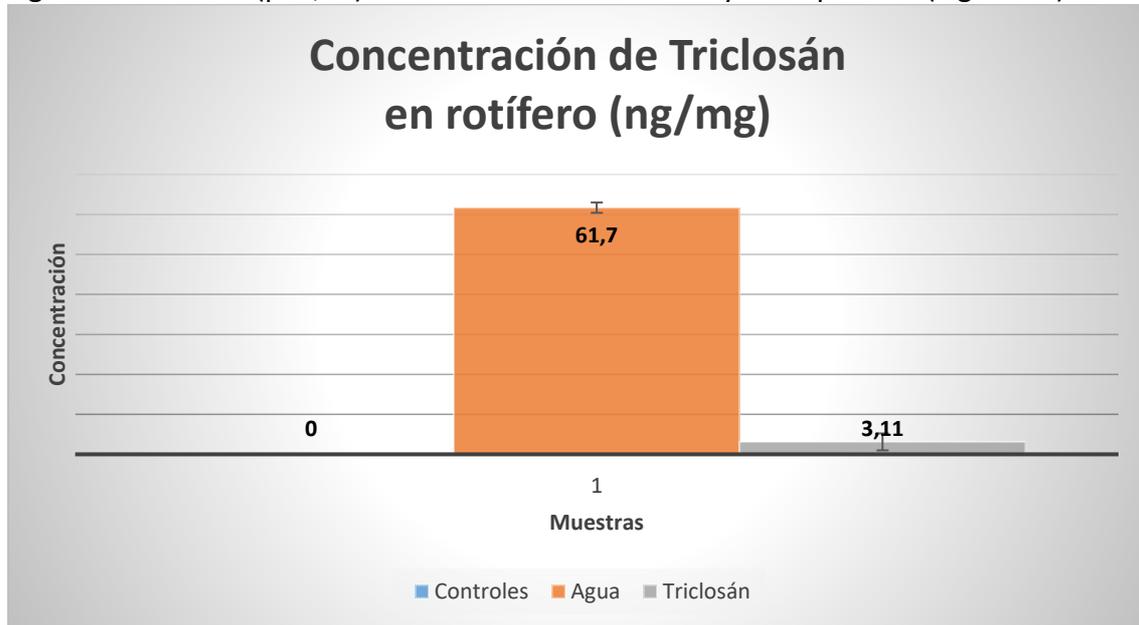


Figura 10: Concentración de triclosán en la biomasa. Se muestran las medias de los valores de contaminante obtenidos en las réplicas de control, las réplicas expuestas a triclosán a través de las microalgas (triclosán) y las réplicas expuestas a través del medio (Agua).

Los niveles del contaminante en biomasa (Figura 10), fueron de casi 62 nanogramos por miligramo de muestra para las réplicas expuestas a triclosán a través del agua (habiéndose aditado a la misma, 0,4 mg/L o el equivalente a 0,4 ng/mg) y de 3,11 ng/mg para el expuesto a través de microalgas, por lo que puede afirmarse la bioacumulación y transferencia del contaminante. Los controles tuvieron un valor medio de 0.

4.3 Diferencia entre contaminantes

Aunque las concentraciones utilizadas son muy diferentes (2,5mg/L para bisfenol-A y 0,4 mg/L para el triclosán), porcentualmente se aprecia una bioacumulación de ambos tóxicos muy semejante respecto al contaminante total obtenido por muestra, siendo de en torno al 95% lo absorbido a través del agua y de sólo el 5% el contaminante respecto al total presente en los rotíferos expuestos a través de la cadena trófica. Esto muestra que la acumulación es mayor cuando el rotífero está expuesto a través del medio, y que la cantidad de contaminante presente en la biomasa microalgal probablemente sea menor que la adicionada al medio (por una posible digestión y excreción del contaminante por parte de la microalga), llegando de esta forma una concentración de contaminante menor al rotífero.

Tabla 1: Concentraciones y porcentajes de contaminante contenida en la biomasa de rotíferos expuestos a través del agua y a través del alimento, en relación con la concentración de contaminante utilizada.

suministrado		concentración			
		agua	proporción	alimento	Proporción
BPA	2,5 mg/L	23,4 ng/mg	9,36	1,31 ng/mg	0,52
TCS	0,4 mg/L	61,7 ng/mg	154,25	3,11 ng/mg	7,775

En la tabla 1 se pueden ver las diferencias entre ambos contaminantes, tanto en valores suministrados durante el ensayo, como las concentraciones obtenidas en las muestras de biomasa de rotífero al final del mismo y su relación respecto a la concentración suministrada. Añadiendo unas concentraciones diarias al agua de 2,5 y 0,4 mg/L para el bisfenol-A y el triclosán respectivamente, en el caso primero, se obtuvo una concentración en biomasa de rotífero de 23,4 ng/mg (unidades equivalentes a mg/Kg), que es una acumulación muy alta dentro o alrededor del rotífero, de hasta 9,36 veces más que la suministrada y en cambio sólo del 0,52 a través de la alimentación (la concentración obtenida en la biomasa de rotíferos era la mitad aproximadamente de la suministrada a las microalgas con las que eran alimentados).

Por el contrario, en el caso del triclosán, siendo una concentración suministrada más de 6 veces menor que el bisfenol-A, se obtuvo en el rotífero expuesto a través del medio, una concentración 154,25 veces mayor, mientras que en el alimento sólo era 7,775 veces más alta.

De estos resultados se puede deducir que el triclosán se acumula más que el bisfenol A tanto en la exposición a través del agua como a través de la cadena trófica (aun suministrando una concentración 6 veces inferior, la cantidad presente en la biomasa de rotíferos era de 17 veces mayor en los expuestos a través del agua, y de 7 a través del alimento).

Hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las réplicas de rotíferos expuestas a través del medio y a través de la alimentación, respecto a los controles, pero no entre los dos primeros grupos, en ambos contaminantes.

5. Conclusiones

1. El triclosán se acumula más en la biomasa de rotífero que el bisfenol A.
2. La acumulación de ambos contaminantes en rotífero es mayor a través del medio que a través de la cadena trófica, siendo aún mayor en el caso del triclosán que en el bisfenol-A.
3. La gran cantidad de contaminante presente en las muestras expuestas a través del medio, puede deberse a la presencia de contaminante dentro de los rotíferos (absorbido o ingerido) o adherido en su superficie, dado que tan altos valores de contaminante presente en la muestra no concuerdan con los valores obtenidos de crecimiento y fertilidad (son semejantes a los obtenidos en los expuestos a través de la alimentación, pero la concentración de contaminante obtenida en las muestras expuestas a través de la alimentación es mucho menor que en las expuestas a través del agua).

6. Bibliografía

1. Fabregas J, Abalde J, Herrero C, Cabezas B, Veiga M. (1984) *Growth of the marine microalga Tetraselmis suecica in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations*. Aquaculture, 42(3-4):207-215
2. FAO. 2017. (<http://www.fao.org/docrep/003/W3732E/w3732e0e.htm>)
3. Flint S1, Markle T, Thompson S, Wallace E. (2012), *Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective*. J Environ Manage. Aug 15; 104:19- 34.
4. Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, Maghuin-Rogister G, Pironnet AM, Pussemier L, Scippo ML, Van Loco J, Covaci A. (2012), *A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol- A*. Food Chem Toxicol. Oct;50(10):3725-40.
5. Gilbert P1, McBain AJ. (2002), *Literature-based evaluation of the potential risks associated with impregnation of medical devices and implants with triclosan*. Surg Infect (Larchmt). 2002;3 Suppl 1: S55-63.
6. Guiry, M.D. & Guiry, G.M. AlgaeBase. *World-wide electronic publication*. National University of Ireland, Galway, 2018.
7. Heath, R., Rubin, J. Holland, D., Zhang E., Snow, M., Rock, C (2002), *Mechanism of Triclosan Inhibition of Bacterial Fatty Acid Synthesis*. The Journal of Biological Chemistry 274, 11110-11114.
8. Meglitsch, P.A. (1972). *Invertebrate Zoology*. 887 pp. Oxford University Press, Oxford.
9. Pourriot, R. (1991). *Los Rotíferos*. Pp: 213-231. Acuicultura, 1. Bernabé, G. (Ed.). Omega, Barcelona.
10. Rioboo, C., Prado, R., Herrero, C. y Cid, Á. (2007), *Population growth study of the rotifer Brachionus sp. fed with triazine-exposed microalgae*. Aquatic Toxicology, nº 83 247-253.
11. Ruttner-Kolisko, A. (1974). *Plankton rotifers: biology and taxonomy*. 146 pp. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
12. Seoane M., Esperanza M., Rioboo C., Herrero C., Cid Á. (2017), *Flow cytometric assay to assess short-term effects of personal care products on the marine microalga Tetraselmis suecica*. Chemosphere (Elsevier), nº 171, 339- 347.
13. Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR. (1998), *A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A*. Chemosphere. Apr;36(10):2149-73.
14. Tatarazako, N., Ishibashi, H., Teshima, K., Kishi, K., Arizono, K., (2004), *Effects of triclosán on various aquatic organisms*. Environmental. Science. 11, 133-140.
15. Waller, N. J. and Kookana, R. S. (2009), *Effect of triclosan on microbial activity in australian soils*. Environmental Toxicology and Chemistry, 28: 65–70.
16. Zhang, L.-H. and Dong, Y.-H. (2004), *Quorum sensing and signal interference: diverse implications*. Molecular Microbiology, 53: 1563–1571.