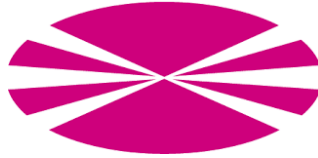


UNIVERSIDAD DE A CORUÑA
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Celular y Molecular
Área de Microbiología



Efecto del bisfenol A, un microcontaminante acuático emergente, sobre la microalga marina *Tetraselmis suecica*

Efecto do bisfenol A, un microcontaminante acuático emerxente, sobre a microalga mariña *Tetraselmis suecica*

Effect of bisphenol A, an emergent aquatic micropollutant, on the marine microalga *Tetraselmis suecica*

Sabela Torres Maroño
A Coruña, 29 de Junio, 2015

Dirigido por la Dra. Ángeles Cid Blanco

El presente trabajo de 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 la Dra. Ángeles Cid Blanco, Profesora Titular de Universidad de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña.

INDICE

Resumen	2
1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVO	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1 Descripción de la especie.....	7
3.2 Bisfenol A	8
3.3 Cultivo microalgal.....	8
3.4 Determinación de la densidad celular.....	9
3.5 Determinación espectrofotométrica de pigmentos	9
3.6 Análisis de la actividad celular.....	10
3.7 Diseño experimental.....	11
3.8 Análisis estadístico.....	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4.1 Crecimiento	12
4.2 Pigmentos.....	15
4.3 Actividad celular	18
5. CONCLUSIONES.....	20
6. BIBLIOGRAFÍA.....	22

Resumen

Los microcontaminantes emergentes como el bisfenol A son objeto de estudio en la actualidad por el escaso conocimiento que se posee de éstos al pasar de inadvertida su presencia en el medio ambiente y las consecuencias de la misma. El bisfenol A, empleado industrialmente en numerosos sectores está presente en los ecosistemas acuáticos, vulnerables a la exposición de diferentes productos químicos que afectan de forma directa o indirecta a la biota residente en el medio, como las microalgas que constituyen parte del fitoplancton, base la cadena alimenticia y responsables de más del 50% de la productividad fotosintética primaria en la Tierra.

En este trabajo se estudió el posible efecto tóxico del microcontaminante emergente bisfenol A sobre la microalga marina *Tetraselmis suecica*, una especie importante en el sector de la acuicultura. Los cultivos de *T. suecica* se expusieron a concentraciones de 0,01 ; 0,5 y 1 mg l⁻¹ de BPA durante 72 h y se analizaron los parámetros de crecimiento, contenido celular de pigmentos (clorofila a y clorofila b) y actividad celular frente a un control en ausencia de BPA. Todos los parámetros analizados han mostrado diferencias significativas entre al menos dos de los cultivos expuestos a diferentes concentraciones de bisfenol A, con lo que podemos determinar que el contaminante ejerce un efecto tóxico sobre el metabolismo de *T. suecica* y que ésta podría emplearse como indicadora de estrés ambiental por su alta sensibilidad a los parámetros analizados.

Palabras clave: *Tetraselmis suecica*, bisfenol A, toxicidad, crecimiento, pigmentos, actividad celular

Resumo

Os microcontaminantes emerxentes como o bisfenol A son obxecto de estudio na actualidade polo escaso coñecemento que se posee deles ao pasar de inadvertida a súa presenza no medio ambiente e as consecuencias da mesma. O bisfenol A, empleado industrialmente en numerosos sectores está presente nos ecosistemas acuáticos, vulnerables á exposición de diferentes produtos químicos que afectan de forma directa ou indirecta á biota residente no medio, como as microalgas que constitúen parte do fitoplancton, base da cadea alimenticia e responsables de máis do 50% da produtividade fotosintética primaria na terra.

Neste traballo estudouse o posible efecto tóxico do microcontaminante emerxente bisfenol A sobre a microalga mariña *Tetraselmis suecica*, importante no sector dea acuicultura. Os cultivos de *T. suecica* expuxéronse a concentracións de 0,01 ; 0,5 e 1 mg l⁻¹ de BPA durante 72 h e analizáronse os parámetros de crecemento, contido celular de pigmentos (clorofila a e clorofila b) e actividade celular fronte a un control en ausencia de BPA. Todos os parámetros analizados mostraron diferenzas significativas entre polo menos dous dos cultivos expostos a diferentes

concentracións de bisfenol A, co que podemos determinar que o bisfenol A exerce un efecto tóxico sobre o metabolismo de *T. suecica* e que ésta podería empregarse como indicador de estrés ambiental pola súa alta sensibilidade aos parámetros analizados.

Palabras chave: *Tetraselmis suecica*, bisfenol A, toxicidade, crecemento, pigmentos, actividade celular.

Abstract

The emerging micropollutants such as Bisphenol A are nowadays object of study due to the limited knowledge we have about them because of its unnoticed presence and consequences in the environment. Bisphenol A is industrially used in numerous sectors and it is present in the aquatic ecosystems, which are vulnerable to be exposure to diverse chemical products that affect, on a direct or indirect way, the living biota in the environment (as the microalgae that constitute part of the phytoplankton, which is the basis of the food chain and responsible for more than 50% of the production of primary photosynthesis on Earth). In this work, it has been studied microalga *Tetraselmis suecica*, an important species in the aquaculture sector. The crops of *Tetraselmis suecica* were exposed to concentrations of 0,01; 0,5 and 1 mg l⁻¹ of BPA through 72 hours and the parameters of growth, the content of cellular pigment (chlorophyll *a* and chlorophyll *b*) and cellular activity were analysed facing a control between at least two of the exposed crops to the different concentrations of Bisphenol A, with which we can determine that the contaminant exerts a toxic effect on the metabolism of *Tetraselmis suecica* and that it could be use as a indicator of environmental stress due to the high sensibility to the analyzed parameters.

Keywords: *Tetraselmis suecica*, Bisphenol A, toxicity, growth, pigments, cellular activity.

1. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas acuáticos son vulnerables a la exposición de diversos productos químicos que afectan de forma directa o indirecta a la biota residente en el medio (Olea *et al.*, 1998). Estos ecosistemas, como mares, ríos o lagos, se ven afectados, entre otros, por contaminantes emergentes; contaminantes de los que se desconoce su nivel de toxicidad y no presentan regulación legal, que penetran fácilmente en el medio como consecuencia de diferentes actividades y procesos antropogénicos. En la actualidad, los compuestos químicos empleados en uso comercial se estiman alrededor de más de 100.000 tan solo en Europa, y este número aumenta cada año con el registro de nuevas sustancias (Goldman, 2002). Las industrias estadounidenses más influyentes asumieron en el año 2001 haber liberado al agua, al aire y en vertebrados sobre 2.795 millones de kg en sustancias químicas (EPA (USA), 2005). Éstas se vuelven tóxicas y peligrosas para el ambiente debido a la persistencia temporal y su bioacumulación (Engler, 2012).

Los contaminantes emergentes son objeto de estudio en la actualidad por el escaso conocimiento que se posee de éstos al pasar de inadvertida su presencia en el medio ambiente y las consecuencias de la misma. El bisfenol A (bisphenol A, BPA), contaminante emergente muy común, es empleado industrialmente en la síntesis del policarbonato, como intermediario de reacción en la fabricación de resinas epoxi, o aditivo en retardantes de llama (Staples, 1998). Es liberado incluso en la esterilización en autoclave de frascos de cultivo (Krishan *et al.*, 1993), pero sólo a niveles detectables en su primer uso (Sun *et al.*, 2000).

La gran cantidad de aplicaciones que tienen estos compuestos en la industria aumentan su producción, responsable de su liberación al medio y un contacto íntimo inevitable entre los seres vivos, el ambiente que los rodea y este tipo de sustancias (Mihaich *et al.*, 2009; Flint *et al.*, 2012). Estos residuos industriales generados a gran escala provocan su acumulación en ríos y sedimentos, que serán transportados como destino final al ambiente marino, al que pueden acceder también mediante el aporte de aguas subterráneas contaminadas por la difusión de sustancias a través del sedimento. (Zafra, 2001). Las aguas subterráneas provenientes de filtraciones de vertederos son el origen de la mayor parte de las altas concentraciones de BPA en los ecosistemas marinos (Kawagoshi *et al.*, 2003; Coors *et al.*, 2003). Estudios publicados sobre el BPA en animales de experimentación confirman sus efectos a bajas dosis (Voom Saal *et al.*, 2007).

En los últimos años ha aumentado el interés por el BPA al ser catalogado como un disruptor químico endocrino (García *et al.*, 2012) y estar relacionado con diversos trastornos orgánicos. Se ha propuesto que este componente puede jugar un papel importante, por ejemplo, en cánceres del aparato reproductor, problemas de fertilidad y otras alteraciones relacionadas con las hormonas (Ruiz, 2010).

El BPA se cataloga también como sustancia obesogénica, al producirse un aumento de la lipogénesis (Baillie *et al.*, 2002; Basheer *et al.*, 2004; García *et al.*, 2012) en los

organismos portadores. Se ha podido comprobar la relación entre la exposición al BPA y la obesidad, resultando la presencia de niveles de BPA séricos significativamente más elevados en mujeres que presentan obesidad que en mujeres no obesas (Takeuchi *et al.*, 2004).

La base de la cadena alimentaria también se ve afectada por la toxicidad del BPA, al incidir sobre las microalgas de diferentes sistemas acuáticos que forman parte del fitoplancton (Satyanarayana *et al.*, 2011), y ser las responsables de más del 50% de la productividad fotosintética primaria en la tierra (Hosikian *et al.*, 2010).

La importancia de las microalgas es muy elevada en lo referente a la biotecnología, donde se emplean en distintos sectores como el ambiental, farmacéutico, energético y sanitario (Harun *et al.*, 2010) y en la alimentación de animales y acuicultura (Carballo-Cárdenas *et al.*, 2003; Pomomarenko *et al.*, 2004).

En el sector de la acuicultura destaca la microalga marina *Tetraselmis suecica*, utilizada como alimento vivo para larvas de moluscos, crustáceos y peces (Ulloa, 2012), por lo que su interés comercial es muy elevado. Se emplea también en la producción de biodiesel (Chisti, 2007) por la facilidad de cultivo en un sistema continuo y por su alta productividad celular (Rodolfi *et al.*, 2009) y en los sectores sanitario, cosmético y alimentario (Lee *et al.*, 2009) al ser productora de antioxidantes, como la clorofila (Hosikian *et al.*, 2010).

2. OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo es evaluar el potencial efecto tóxico del microcontaminante emergente bisfenol A (BPA), componente activo en la fabricación de plásticos y resinas epoxi además de disruptor químico endocrino, sobre la microalga marina de interés comercial y acuícola *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch.

Se evaluará el posible efecto del BPA en *T. suecica* sobre el crecimiento, composición bioquímica en pigmentos y actividad celular, medida como actividad esterasa inespecífica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción de la especie

En el presente estudio se ha empleado la especie *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch, microalga marina que inicialmente se denominaba *Platymonas* se clasificó en la clase *Chlorophyceae*, aunque actualmente se encuentra clasificada en la clase *Prasinophyceae*, dentro de la división *Chlorophyta*.

T. suecica es una microalga marina unicelular de color verde, debido a la presencia de clorofila *a* y *b*, que presenta generalmente una forma oval con 4 flagelos isodinámicos que salen de una invaginación apical que se observa en la porción anterior de la célula y que está ubicada en la misma dirección en la que avanza. Se ha determinado su tamaño celular por granulometría laser resultando su longitud media en 8 micrómetros (Monrineau *et al.*, 2001) mientras que su diámetro oscila entre 10 - 15 micrómetros.

La reproducción se lleva a cabo por división celular binaria, momento en el que las células pierden su estado móvil, y las dos células hijas ya están completamente flageladas antes de la liberación de la teca (Butcher, 1959).

Tetraselmis suecica (Kylin) Butcher está considerado como el flagelado marino más fácil de cultivar a gran escala, por eso es una de las especies más utilizadas en acuicultura y se emplea como alimento para larvas de moluscos, crustáceos y peces, gracias a que proporciona una fuente muy atractiva de ácidos grasos de cadena larga (Fábregas *et al.*, 2001). Tiene una composición celular aproximadamente del 10,5% en proteína, 51,9% en lípidos y 14% en lípidos (Azma *et al.*, 2009), estos últimos importantes en relación con el estudio realizado. Sin embargo, la cantidad de todos los componentes puede variar en función de las condiciones y el sistema de cultivo (Carballo-Cárdenas *et al.*, 2003).



Fig. 1. Fotografía de una célula de *T. suecica* (Ulloa, 2012).

3.2 Bisfenol A

El bisfenol A (4,4'-isopropilideno difenol, BPA) fue sintetizado por primera vez en 1891 por A. P. Dianin haciendo reaccionar fenol con acetona en medio ácido, obteniendo así los primeros cristales de este compuesto.

BPA es el monómero empleado para la síntesis del policarbonato, plástico utilizado en multitud de aplicaciones gracias a su dureza y resistencia térmica. Se usa también como intermediario de reacción en la fabricación de resinas epoxi, fenoxi, polisulfona y determinadas resinas de poliéster, además de como aditivo en retardantes de llama o en el caucho o en otros plásticos, formando parte de la composición de productos tales como materiales ignífugos, líquido de frenos o papel térmico, y de numerosos plásticos de utilización diaria, como juguetes, lentes oculares o adhesivos (Staples, 1998).

Desde un punto de vista ambiental, el BPA presenta propiedades estrogénicas, por lo que se ha descrito como un disruptor químico endocrino (García-Mayor *et al.*, 2012) que tiene la capacidad de activar o bloquear la actividad de los receptores estrógenos humanos, pudiendo desencadenar toda una batería de respuestas estrogénicas celulares de igual o mayor eficacia y potencia que el propio estradiol (Welshons *et al.*, 2003, 2006). Interactúa también con otros receptores como el de la hormona tiroidea y se ha catalogado como sustancia que afecta a la fertilidad (Geens *et al.*, 2012).

En este estudio se ha empleado BPA comercializado por Sigma-Aldrich® con una pureza del 99%. Se ha preparado una solución stock muy concentrada, disolviéndolo en dimetilsulfoxido (DMSO). Las diferentes concentraciones utilizadas en cada ensayo nunca superan el 5% del volumen final total. En este trabajo los cultivos microalgales se exponen a concentraciones de 0,01 ; 0,5 y 1 mg l⁻¹.

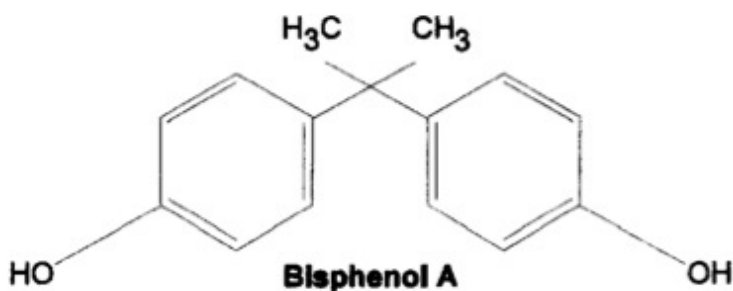


Fig. 2. Estructura molecular del bisfenol A (BPA) (Staples, 1998).

3.3 Cultivo microalgal

Los cultivos de *Tetraselmis suecica* se realizan en agua de mar filtrada por 5 µm y esterilizada en autoclave durante 20 min a 120°C. El medio de cultivo nutritivo empleado es Algal-1 (Fábregas, 1984) preparado a partir de una solución de

macroelementos y otra de oligoelementos realizadas en agua destilada, que se esterilizan en autoclave. Posteriormente, se mezclan en condiciones de esterilidad y el medio se refrigera el medio a 4° C.

Los cultivos stock se mantienen en una cámara de cultivo en botellas Pyrex de 500 ml con aireación filtrada mediante filtros *Milipore FG* de 0,20 µm de poro. La cámara de cultivo presenta unas condiciones controladas de luz y temperatura, manteniendo una temperatura constante de 18±1°C y una intensidad lumínica de 68,25 µm fotón m⁻² s⁻¹ proporcionada por tubos fluorescentes *Phillips TLD* de 36 W, con un ciclo de 24 h de periodos luz-oscuridad (12 h de luz- 12 h de oscuridad).

Los ensayos se llevan a cabo cultivando las células en tubos *Kimax* con 40 ml de medio de cultivo. Todos los cultivos se realizan por triplicado, en las mismas condiciones ambientales que los cultivos stock.

3.4 Determinación de la densidad celular

La densidad celular se va a determinar diariamente, cada 24 h, mediante el recuento de alícuotas tomadas de los diferentes cultivos, tanto control como expuestos a las diferentes concentraciones de BPA ensayadas. Para el recuento se fijan las células con lugol y se cuentan en una cámara Improved Neubauer utilizando un microscopio óptico de contraste de fases NIKON Labophot.

Las tasas de crecimiento (µ) hasta las 72 h para las diferentes concentraciones de BPA se van a calcular mediante la fórmula:

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

Donde µ es la tasa de crecimiento expresada en días⁻¹, t₀ y t son el tiempo inicial y final del periodo estudiado, ambos expresados en días, y N₀ y N_t el número de células en dichos tiempos.

El cálculo de la concentración efectiva 50 para el crecimiento (EC 50, concentración que reduce en 50% un parámetro) se lleva a cabo a las 72 h por interpolación gráfica (Walsh et al., 1987).

3.5 Determinación espectrofotométrica de pigmentos

En el análisis espectrofotométrico del contenido en pigmentos de *T. Suecica* se recogen las células por centrifugación de un volumen determinado de cultivo de los ensayos en una centrífuga refrigerada Multifuge 3L-R Heraeus a 4500 rpm durante 15 min a 4°C. Se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet en un volumen conocido de acetona:metanol (2:1). Tras este paso se mantienen a una temperatura de 4°C durante 24 h y en oscuridad total para que la extracción sea completa. Pasado este tiempo se vuelve a centrifugar para retirar los restos celulares y recoger los pigmentos extraídos que se encuentran en el sobrenadante. Las lecturas de

absorbancia se realizan a 647 y 664 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A, 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 van a variar en función del solvente utilizado (Parsons y Strickland, 1965). De los propuestos hasta la fecha, se han optado los de Jeffrey y Humphrey (Jeffrey y Humphrey, 1975) para las clorofilas, usando una mezcla de acetona:metanol (2:1) como solvente.

Las ecuaciones empleadas para la determinación espectrofotométrica de pigmentos han sido:

$$[\text{Clorofila } a] = 11,93 A_{664} - 1,93 A_{647}$$

$$[\text{Clorofila } b] = 20,36 A_{647} - 5,5 A_{664}$$

Donde [clorofila a] y [clorofila b] son las concentraciones de las clorofilas expresadas en $\mu\text{g ml}^{-1}$ de extracto y A_{664} y A_{647} son las absorbancias de los cultivos medidos a 664 y 647 nm respectivamente.

3.6 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 la célula, esterasas citoplasmáticas no específicas hidrolizan los enlaces éster de la molécula de FDA perdiendo así los residuos acetato. La fluoresceína libre resultante es una molécula polar, hidrofílica, que va a emitir fluorescencia en el espectro del verde cuando es excitada con luz azul (488 nm) y que es retenida por las células cuando la membrana plasmática está intacta. Por este motivo, la ausencia de la fluorescencia verde de la fluoresceína, en células viables con la membrana celular intacta, indicaría posibles efectos tóxicos sobre las esterasas, que son enzimas esenciales para el funcionamiento normal de la célula (Jochem, 2000).

Para el análisis de la actividad celular se ha realizado un ensayo espectrofotométrico para determinar la producción de fluoresceína. Se toman alícuotas de los diferentes ensayos y se les añade FDA, a partir de una solución stock de $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$, obteniendo una concentración final de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. A una réplica se le añade acetona directamente (en una proporción 1:1) para parar la reacción de la molécula de FDA y se mantiene en condiciones de ausencia de luz y a una temperatura de 4°C . Transcurrido un tiempo de 2 h se añade acetona (en proporción 1:1) a las muestras incubadas para extraer la fluoresceína de las células y parar la reacción (Schnüner & Roswell, 1982). Se centrifugan todos los ensayos en una centrífuga refrigerada Multifuge 3L-R Heraeus a 4500 rpm durante 20 min a 4°C y la fluoresceína de los sobrenadantes se mide a 490 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 frente a un blanco de agua destilada.

Los valores de absorbancia obtenidos de los ensayos a tiempo 0 se restan a los resultados de los ensayos incubados durante 2 h. La concentración de fluoresceína se calcula a partir de una recta de calibrado realizada con concentraciones de fluoresceína comprendidas entre $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ y $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ en agua destilada, a partir de una solución stock de fluoresceína de $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$, frente a un blanco de agua destilada.

Los resultados de actividad celular se expresan en $\mu\text{g ml}^{-1}$ de fluoresceína por células y hora.

3.7 Diseño experimental

Para evaluar la posible toxicidad del bisfenol A sobre la microalga *Tetraselmis suecica* se realizaron experiencias a las 72 horas en las que las células se expusieron a concentraciones de contaminante de $0,01$; $0,5$ y 1 mg l^{-1} . Se realizan también controles con cultivos sin contaminantes. Todos los cultivos se establecen a partir de un inóculo en fase de crecimiento exponencial con una densidad celular inicial de $50.000 \text{ células ml}^{-1}$.

Para el recuento de la densidad celular se toman alícuotas cada 24 h hasta las 72 horas y para el análisis de pigmentos y la actividad celular las alícuotas se toman únicamente después de 72 h de cultivo.

3.8 Análisis estadístico

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

Para el análisis estadístico de los datos se emplea el programa IBM SPSS Statistic versión 21.0.0. En cada experiencia, la hipótesis de "la concentración de bisfenol A (BPA) del medio no afecta al parámetro de estudio" se valora mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Cuando esta hipótesis nula se rechaza, se utiliza el test de rango múltiple de Tukey, para analizar de qué forma afecta cada concentración de antibiótico al parámetro que estamos estudiando. El test de Tukey se aplica en todos los casos con un nivel de significación de $0,05$.

En el parámetro del crecimiento también se estudia la hipótesis de que "el efecto de las diferentes concentraciones de bisfenol A en los cultivos varían a lo largo del tiempo" mediante un modelo lineal general de medidas repetidas. La esfericidad se contrastó mediante la prueba de Mauchly; en caso de no asumirse esfericidad el efecto de los factores se contrastó mediante la corrección de Muynh-Felt.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Crecimiento

Uno de los parámetros analizados para determinar el efecto tóxico del microcontaminante emergente BPA en *Tetraselmis suecica* fue el crecimiento. La determinación del número de células o densidad celular es un parámetro fundamental como medida de crecimiento microalgal en ensayos de toxicidad. En la mayoría de estudios, al igual que en éste, la toxicidad es medida en función de la reducción de la tasa de crecimiento o la biomasa final en relación a un control (sin efecto tóxico) (Hogan et al., 2005; Debelius et al., 2008; Nie et al., 2009; Pereira et al., 2009).

En algunos trabajos se ha determinado que el crecimiento puede resultar menos sensible al estudio que otros parámetros como la morfología celular o la producción de pigmentos fotosintéticos (Geoffroy et al., 2007), aunque otros estudios indican por el contrario que éste es el parámetro más sensibles dentro de los estudiados (Franklin et al., 2001; Storm et al., 2009). Esto dependerá del contaminante, el organismo y los parámetros objetos de estudio.

El crecimiento, a pesar de la gran variedad de métodos existentes cada vez más rápidos y prácticos que existen en la actualidad para la detección de contaminantes y su toxicidad, continúa siendo el parámetro más utilizado para la determinación de los posibles efectos tóxicos de un compuesto sobre microalgas en ensayos de toxicidad crónicos (Van Wezel & Van Vlaardingen, 2004).

Los resultados de este estudio reflejan que el parámetro del crecimiento en *T. suecica* se ve afectado por la presencia del microcontaminante en el medio de cultivo. En la figura 3 se representan las curvas de crecimiento de los cultivos microalgales expuestos a las distintas concentraciones de BPA.

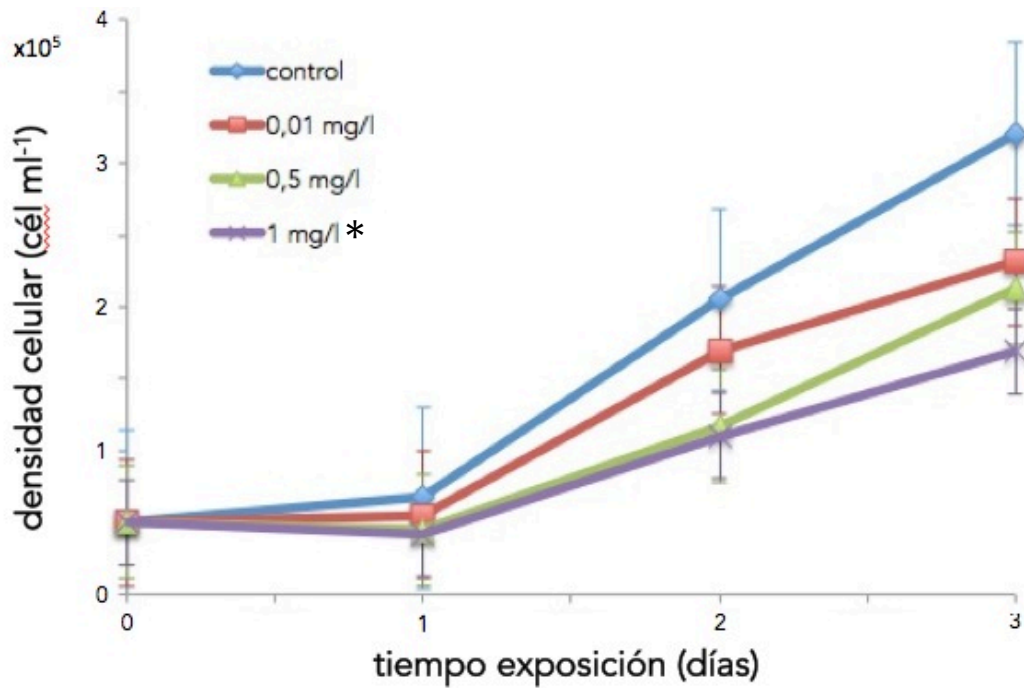


Fig. 3. Curvas de crecimiento de los cultivos de *Tetraselmis suecica* expuestos a diferentes concentraciones de BPA y un control sin contaminante. Los valores que se representan corresponden con la media de tres réplicas para cada tratamiento \pm la desviación estándar. El * indica los cultivos que muestran diferencias significativas con el control.

Los cultivos con las diferentes concentraciones ensayadas y el control, muestran unas curvas de crecimiento con una fase de latencia o lag de 0 a 1 días y una fase posterior de crecimiento exponencial, donde se alcanza en el ensayo control una densidad celular a los 3 días de $3,20 \times 10^5 \pm 0,35 \times 10^5$ cél ml⁻¹.

Los resultados muestran que las distintas concentraciones ensayadas de microcontaminante en los cultivos ejercen un efecto negativo sobre el crecimiento continuado a lo largo del tiempo durante 3 días de *T.suecica*, mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$). Analizando el crecimiento obtenido sólo se muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el control y los cultivos con una concentración de BPA de 1 mg l⁻¹, que indicaría que a menores concentraciones el BPA no ejerce un efecto tóxico significativo sobre el crecimiento de *T. suecica*.

Los valores de a tasa de crecimiento se representan en la Tabla 1:

Tabla 1. Tasas de crecimiento de los diferentes cultivos de *Tetraselmis suecica* expuestos a diferentes concentraciones de bisfenol A y un control sin contaminante. Los valores se corresponden con la media de las tres réplicas para cada ensayo \pm desviación típica.

Cultivo	Tasa crecimiento (día ⁻¹)
Control	0,803 \pm 0,038
0,01 mg/L	0,662 \pm 0,066
0,5 mg/l	0,635 \pm 0,061
1 mg/l	0,527 \pm 0,026

Los resultados reflejados en las tasas de crecimiento muestran que el cultivo sometido a una concentración de BPA de 1 mg l⁻¹ presenta una tasa del 66% de la tasa de crecimiento control, mientras que los cultivos sometidos a concentraciones de 0,01 y 0,5 mg l⁻¹ presentan unas tasas entre el 79 - 82 % de la tasa de crecimiento control.

La concentración efectiva media (EC₅₀) calculada a las 72h es 2,73 mg l⁻¹, valor mucho menor que en estudios previos, donde se ha descrito una EC₅₀ a las 72h de 15,55 mg l⁻¹ (Ebenezer & Ki, 2013) para la misma especie, lo que se puede deber al método empleado en la realización de los cultivos o la cepa empleada.

Otros estudios con diferentes microalgas marinas muestran para *Prorocentrum mínimum* una EC₅₀ de 1,50 mg l⁻¹, para *Cochlodinium polykrikoides* una EC₅₀ de 68,15 mg l⁻¹ (Ebenezer & Ki, 2013) o en *Stephanodiscus hantzschii* una EC₅₀ de 8,65 mg l⁻¹ (Li et al., 2009); lo que indica una menor susceptibilidad al BPA de *T. suecica* en comparación con otras especies marinas.

Los resultados de este estudio muestran que la presencia de BPA en los cultivos de *Tetraselmis suecica* a lo largo del tiempo ejerce un efecto negativo significativo en el crecimiento. En una exposición crónica al contaminante se ha determinado que algunas microalgas marinas se adaptan al medio, no siendo visibles efectos graves de toxicidad que se reflejan en un corto período de exposición (Zhang et al., 2012).

Valorando los resultados obtenidos sólo se concluyen diferencias significativas entre los crecimientos del control y los cultivos expuestos a una concentración de contaminante de 1 mg l⁻¹. En estudios previos con microalgas se ha demostrado que concentraciones entre 1 mg l⁻¹ y 3 mg l⁻¹ de BPA en los cultivos disminuía significativamente la densidad celular de los organismos, permitiendo aun así su crecimiento (Ishii et al., 2003) mientras que en concentraciones superiores el crecimiento se ve totalmente inhibido al destinar la energía celular para la supervivencia y no el crecimiento (Gattullo et al., 2012).

4.2 Pigmentos

Los marcadores bioquímicos se utilizan habitualmente en estudios de posible contaminación de sistemas acuáticos (Banni *et al.*, 2005), al ser estudiados los distintos niveles de metabolitos que contienen las células como productos finales de procesos de regulación celular en respuesta a cambios ambientales producidos en ambientes biológicos, como los sistemas acuáticos (Jamers *et al.*, 2009).

Como biomarcador en la exposición a agentes tóxicos en microalgas suele emplearse el contenido de pigmentos (Couderchet & Vernet, 2003).

En *Tetraselmis suecica* los pigmentos son responsables de la actividad antioxidante de la microalga (Hosikian *et al.*, 2010), por eso tienen un gran interés comercial en los sectores sanitario, cosmético y alimentario (Lee *et al.*, 2009). Por este motivo, se estudia en el presente trabajo el contenido de los pigmentos clorofila *a* y clorofila *b* en cultivos expuestos a diferentes concentraciones del microcontaminante emergente BPA.

En los siguientes gráficos se muestra el contenido total de pigmentos, clorofila *a* y clorofila *b* de los diferentes cultivos a los 3 días (72 h) de exposición al contaminante:

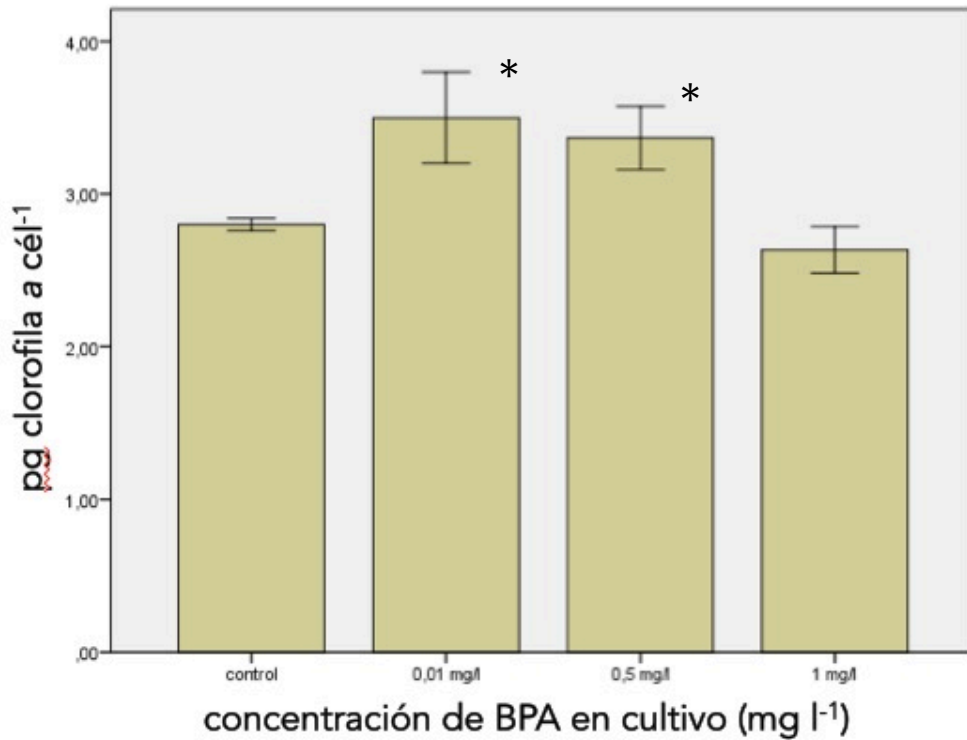


Fig. 4. Contenido celular total de clorofila a en pg cél⁻¹ a las 72 h en los diferentes cultivos de *Tetraselmis suecica* expuestos a diferentes concentraciones de bisfenol A y un control sin contaminante. Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas para cada tratamiento ± desviación estándar. El * indica los cultivos que muestran diferencias significativas con el control.

La concentración celular de clorofila a las 72 h se ve aumentada en los cultivos de *T. suecica* expuestos a unas concentraciones de 0,01 mg l⁻¹ y 0,5 mg l⁻¹ y reducida a una concentración de 1 mg l⁻¹ del contaminante respecto al control, que presenta unos valores de clorofila a de 2,80 ± 0,08 pg cél⁻¹.

Estos valores presentan todos una diferencia de contenido de clorofila a significativa ($p < 0,05$) menos el control con el cultivo expuesto a una concentración de 1 mg l⁻¹ y el cultivo expuesto a una concentración de 0,01 mg l⁻¹ con el expuesto a una concentración de 0,5 mg l⁻¹ de contaminante, que reflejan unos valores similares entre ambos.

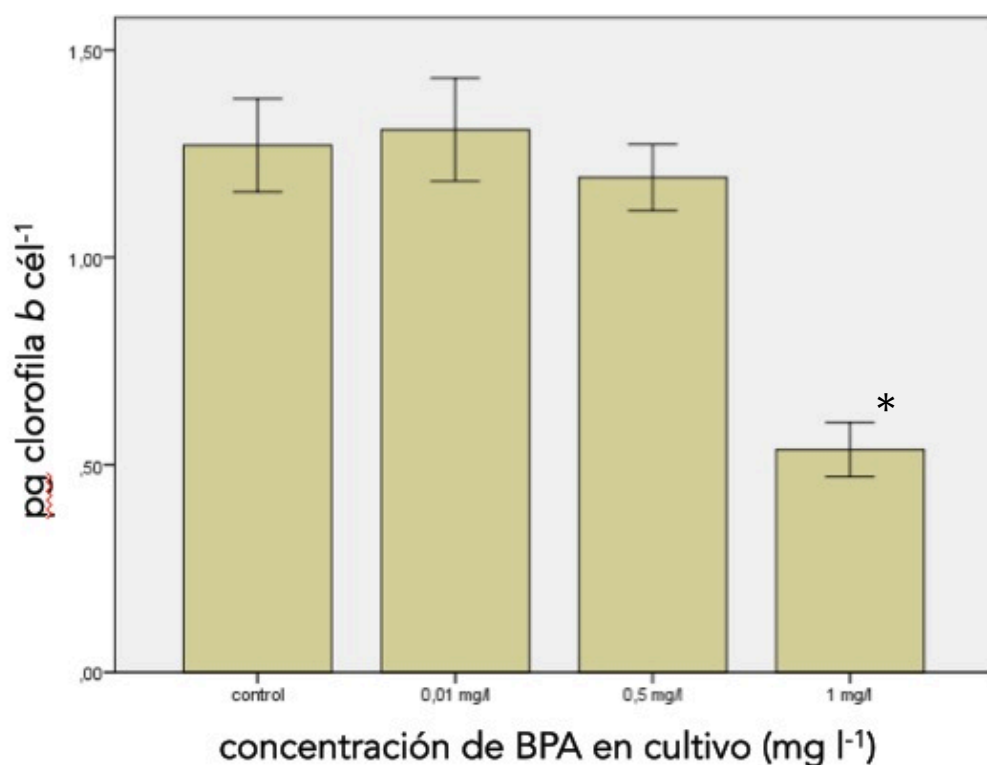


Fig. 5. Contenido celular total de clorofila *b* en pg c \acute{e} l⁻¹ a las 72 h en los diferentes cultivos de *Tetraselmis suecica* expuestos a diferentes concentraciones de bisfenol A y un control sin contaminante. Los valores representados se corresponden con la media de tres r \acute{e} plicas para cada tratamiento \pm desviaci \acute{o} n est \acute{a} ndar. El * indica los cultivos que muestran diferencias significativas con el control.

Las diferencias en el contenido celular total de clorofila *b* son significativas ($p < 0,05$) entre el cultivo expuesto a una concentraci \acute{o} n de contaminante de 1 mg l⁻¹ y todos los dem \acute{a} s cultivos, incluido el control. El control presenta un contenido de clorofila *b* a las 72 h de $1,29 \pm 0,10$ pg c \acute{e} l⁻¹ el cultivo expuesto a una concentraci \acute{o} n de 1 mg l⁻¹ de BPA $0,56 \pm 0,09$ pg c \acute{e} l⁻¹.

Diversos estudios con diferentes especies de microalgas marinas muestran que el aumento de la concentraci \acute{o} n de bisfenol A en los cultivos microalgales disminuye significativamente el contenido celular de pigmentos (Li *et al.*, 2009) y que los niveles de clorofila se ven afectados dr \acute{a} sticamente cuando se supera una concentraci \acute{o} n de 5 mg l⁻¹ de contaminante en el cultivo (Gatullo *et al.*, 2012). Se ha podido establecer que a cantidades superiores a 5 mg l⁻¹ de BPA la microalga sufre rupturas en la pared celular que provocan la p \acute{e} rdua de orden de sus org \acute{a} nulos, su estructura y su color verde, indicador de la desintegraci \acute{o} n del cloroplasto y las mol \acute{e} culas de clorofila (Pardo, 2015).

4.3 Actividad celular

Los valores de actividad metabólica celular del cultivo control y los cultivos expuestos a diferentes concentraciones de bisfenol A muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) a las 72 h (Fig. 6). Los valores oscilan entre $2,33 \pm 0,13$ pg fluoresceína $\text{cél}^{-1} \text{h}^{-1}$ del control y $1,35 \pm 0,01$ pg fluoresceína $\text{cél}^{-1} \text{h}^{-1}$. Las diferencias no son significativas entre los cultivos control y los cultivos expuestos a $0,01 \text{ mg l}^{-1}$ de contaminante, y entre los cultivos expuestos a $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de contaminante y los expuestos a 1 mg l^{-1} de contaminante, coincidiendo estos datos con las concentraciones más próximas.

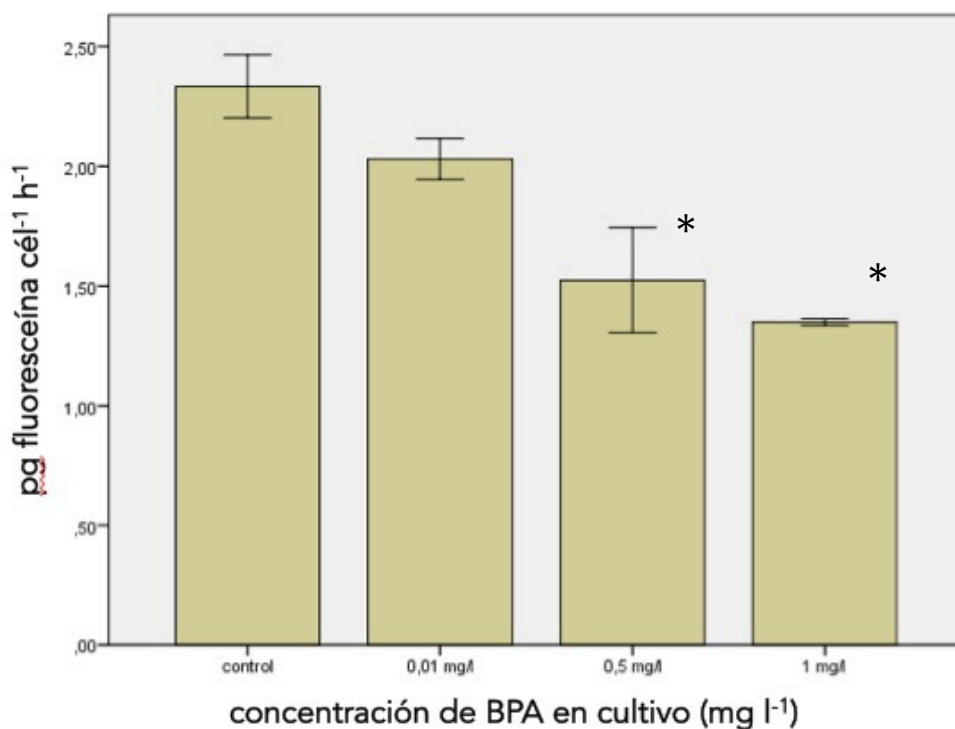


Fig. 6. Actividad metabólica celular en $\text{pg cél}^{-1} \text{h}^{-1}$ de fluoresceína a las 72 h en los diferentes cultivos de *Tetraselmis suecica* expuestos a diferentes concentraciones de bisfenol A y un control sin contaminante. Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas para cada tratamiento \pm desviación estándar. El * indica los cultivos que muestran diferencias significativas con el control.

Todas las células vivas presentan una actividad metabólica, y reflejo de esta es la actividad enzimática. La medida de la inhibición enzimática en microalgas es por tanto un buen indicador de sensibilidad al estrés ambiental (Blaise y Ménard, 1998). Los ensayos de la actividad esterasa se relacionan con la actividad metabólica celular general (Dorsey et al., 1989; Regel et al., 2004; Li et al., 2011).

Los resultados obtenidos las 72 h muestran que la presencia de BPA altera la actividad metabólica celular de *T. suecica* ejerciendo un efecto directamente proporcional negativo con el aumento de la concentración de microcontaminante en los cultivos, lo que refleja una respuesta al estrés ambiental provocado por el bisfenol A. Estudios previos demuestran el efecto negativo del bisfenol A sobre la actividad celular en *Nannochloropsis gaditana* (Pardo, 2015).

Valorando los resultados obtenidos resultaría interesante la realización de un estudio de contenido lipídico tras la exposición al BPA y de la composición de lípidos celulares.

5. CONCLUSIONES

La exposición de los cultivos de *Tetraselmis suecica* a diferentes concentraciones del microcontaminante emergente bisfenol A (BPA) provoca diferencias significativas en los parámetros analizados (crecimiento, contenido en pigmentos y actividad celular), que indican que el BPA es un componente tóxico para esta especie de microalga. El parámetro de actividad celular ha presentado una mayor sensibilidad al contaminante, resultando el mejor parámetro como indicador de la calidad ambiental.

Procedería ensayar los mismos parámetros con concentraciones mayores de BPA, ya que a bajas concentraciones la mayoría de los parámetros no muestran diferencias significativas.

Valorando estos resultados *Tetraselmis suecica*, por su alta sensibilidad a los parámetros analizados, podría ser una buena indicadora de estrés y calidad ambiental.

Conclusiones

A exposición dos cultivos de *Tetraselmis suecica* a diferentes concentración do microcontaminante emerxente bisfenol A (BPA) provoca diferenzas significativas nos parámetros analizados (crecemento, contido en pigmentos e actividade celular), que indican que o BPA é un compoñente tóxico para esta especie de microalga. O parámetro de actividade celular presentou unha maior sensibilidade ao contaminante, resultando o mellor parámetro como indicador da calidade ambiental.

Procedería ensaiar os mesmos parámetros con concentracións maiores de BPA, xa que a baixas concentracións a maioría dos parámetros non mostran diferenzas significativas.

Valorando estes resultados *Tetraselmis suecica*, pola súa alta sensibilidade aos parámetros analizados, podería ser unha boa indicadora de estrés e calidade ambiental.

Conclusions

The *Tetraselmis suecica* crops exposure to different concentrations of the emerging micropollutant Bisphenol A (BPA) causes significant differences in the analyzed parameters (growth, pigmental content and cellular activity), which indicates that BPA is a toxic component for this particular microalga species. The cellular activity parameter has shown a larger sensitivity of the contaminant, turning out the best parameter to indicate the environmental quality.

It could be appropriate to test the same parameters in larger concentrations of BPA, since at lower concentrations most of the parameters do not show significant differences.

Appreciating all of these results, *Tetraselmis suecica*, for its high sensibility to the analyzed parameters, could be a great indicator of the environment stress and quality.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Azma, M., Rahim, R. A., Mohames, R. & Ariff, A. B. (2009) Heterotrophic cultivation of microalga *Tetraselmis suecica* in stirred tank bioreactor for biomass and bio-fuel production. *International Advanced of Technology Congress*. Malaysia.
- Baillie-Hamilton, P.F. (2002). Chemical Toxins: A hypothesis to explain the global obesity epidemic. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 8 (2): 185-192.
- Banni, M., Jebali, J., Daubeze, M., Clerandau, C., Guerbej, H., Narbonne, J. F. & Boussetta, H. (2005). Monitoring pollution in Tunisian coasts: application of a classification scale based on biochemical markers. *Biomarkers*. 10: 105- 116.
- Basheer, C., Lee, H., & Tan, K. (2004). Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol-A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. *Marine Pollution Bulletin*, 48, 1145-1167.
- Blaise, C. & Ménard, L. (1998). A micro-algal solid phase test to assess the toxic potential of freshwater sediments. *Water Quality Research Journal of Canada*. 33: 133- 151.
- Butcher, R. W. (1959). An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. I. Introduction and Chlorophyceae. *Fishery Investigations (Great Britain Ministry of Agriculture, Fisheries and Food)* . 4: 71-74.
- Carballo-Cárdenas, E. C., Tuan, P. M., Janssen, M. & Wijffels, R. H. (2003) Vitamin E (α -tocopherol) production by marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering*. 20: 139-147.
- Chisti, F. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25:294–306.
- Coors, A., Jones, P. D., Giesy, J. P. & Ratte, H. T. (2003). Removal of estrogenic activity from municipal waste landfill leachate assessed with a bioassay based on reporter gene expression. *Environmental Science and Technology*. 37: 3430-3434.
- Couderchet, M. & Vernet, G. (2003). Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 55: 271-277.
- Debelius, B., Forja, J. M., Del Vals, A. & Lubián, L. M. (2008). Effect of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and atrazine on marine microalgae. *Marine Pollution Bulletin*. 57: 559-568.
- Dorsey, J., Yentsch, C. M., Mayo, S. & McKenna, C. (1989). Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae. *Cytometry*. 10: 622-628.
- Ebenezer, V. & Ki, J. (2013). Quantification of the sub-lethal toxicity of metals and endocrine-disrupting chemicals to the marine Green microalga *Tetraselmis suecica*. *Fisheries and Aquatic Sciences*. 16 (3): 1-8.
- Engler, R. J. (2012). The Complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean. *Environmental Science and Technology*. 46: 12302-

- 12315.
- Environmental Protection Agency (USA). (2005). Cross-species mode of action information assessment: a case study of bisphenol A. *Government Reports Announcements & Index, Issue. 26*. National Center for Environmental Assessment.
 - 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.
 - Fábregas, J., Otero, A., Domínguez, A. & Patiño, M. (2001) Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. *Journal of Marine Biotechnology* 3:256–263.
 - Flint, S., Markle, T., Thompson, S., & Wallace, E. (2012). Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. *Journal of Environmental Management*. 104: 19-34.
 - Franklin, N. M., Adams, M. S., Stauber, J. L. & Lim, R. P. (2001). Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 40: 469-480.
 - Garcia-Mayor, R. V., Larrañaga, A., Docet, M. F. & Lafuente, A. (2012). Disruptores endocrinos y obesidad: obesógenos. *Endocrinología y nutrición*. 54(4): 261-267
 - Gattullo, C. E., Bährs, H., Steinberg, C. E. W. & Loffredo, E. (2012). Removal of bisphenol A by the freshwater Green alga *Monoraphidium braunii* and the role of natural organic matter. *The Science of the Total Environment*. 416: 501-506.
 - Geens, T., Aerts, D., Berthot, C., Bourguignon, J. P., Goeyens, L., Lecomte, P. & Covaci A. (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol A. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Publish for the British Industrial Biological Research Association*. 50(10): 3725-3740
 - Geoffroy, L., Gilbin, R., Simon, O., Floriani, M., Adam, C., Pradines, C., Cournac, L. & Garnier-Laplace, J. (2007). Effect of selenate on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*. 83: 149-158.
 - Goldman, L.R. (2002). Preventing pollution? U.S. toxic chemicals and pesticides policies and sustainable development. Informe Environmental Law Report News & Analysis. 32: 11018-11041.
 - Hosikian, A., Lim, S., Halim, R. & Danquah, M. K. (2010). Chlorophyll extraction from Microalgae: A review on the process engineering aspects. *International Journal of Chemical Engineering*. DOI:10.1155/2010/391632.
 - Ishii, H., Saito H., Akiyama, N. & Kobayashi, Y. (2003). Effects of endocrine disrupter chemicals bisphenol A and p-nonylphenol on marine microalga *Nannochloropsis oculata* ST-3. *Journal of The School of Marine Science and Technology*. 1 (1): 93-98
 - Jamers, A., Blust, R. & De Coen, W. (2009). Omics in algae: Paving the way for systems biological understanding of algal stress phenomena? *Aquatic Toxicology*. 92: 114-121.

- Jochem, F. J. (2000). Probing the physiological state of phytoplankton at the single cell level. *Scientia Marina*. 64: 183-195
- Kawagoshi, Y., Fujita, Y., Kishi, I. & Fukunaga, I. (2003). Estrogenic chemicals and estrogenic activity in leachate from municipal waste landfill determined by yeast two-hybrid assay. *Journal of Environmental Monitoring*. 5: 269-274.
- Krishnan, A. V., Starhis, P., Permuth, S. F., Tokes, L. & Feldman, D. (1993). Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*. 132: 2279-2286.
- Lee, S. H., Chang, D. U., Lee, B. J. & Jeon Y. J. (2009) Antioxidant activity of solubilized *Tetraselmis suecica* and *Chlorella ellipsoidea* by enzymatic digests. *Journal of Food Science and Nutrition*. 14: 21-28.
- Li, J., Ou, D., Zheng, L., Gran, N. & Song, L. (2011). Applicability of the fluorescein diacetate assay for metabolic activity measurement of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria). *Phycological Research*. 59(3): 200-207.
- Li, R., Chen, G. Z., Tam, N. F. Y., Luan, T. G., Shin, P. K. S., Cheung, S. G. & Liu, Y. (2009). Toxicity of bisphenol A and its bioaccumulation and removal by a marine microalga *Stephanodiscus hantzschii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72(2): 321-328.
- Morineau, T. O., Legentilhomme, P., Jaouen, P., Lepine, B. & Rince, Y. (2001) Influence a swirl motion on the interaction between microalgal cells and environmental medium during ultrafiltration of a culture of *Tetraselmis suecica*. *Biotechnology Letters*, 23: 1539-1545.
- Nie, X., Gu, J., Lu, J., Pan, W. & Yang, Y. (2009). Effects of norfloxacin and butylated hydroxyanisole on the freshwater microalga *Scenedesmus obliquus*. *Ecotoxicology*. 18: 677-684
- Pardo Castillo, M. C. (2015) . Efecto tóxico del contaminante acuático bisfenol A sobre la microalga marina *Nannochloropsis gaditana*. Trabajo fin de máster. Máster Interuniversitario en Acuicultura. Universidad de Santiago de Compostela.
- Parsons, T. R. & Strickland, J. D. H. (1965). Particulate organic matter. III. I. Pigment analysis. III. II. Determination of phytoplankton pigments. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 18: 117-127.
- Pereira, J. L., Antunes, S. C., Castro, B. B., Marques, C. R., Gonçalves, A. M. M., Gonçalves, F. & Pereira, R. (2009). Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulations versus active ingredient. *Ecotoxicology*. 18: 455-463.
- Pomomarenko, L. P., Stonik, I. V., Aizdaicher, N. A., Yu, O. T., Popovskaya, G. I., Pomazkina, G. V. & Stonik, V. A. (2004). Sterols of marine microalgae *Pyramimonas cf. cordata* (Prasinophyta), *Attheya ussurensis* sp. nov. (Bacillariophyta) and a spring diatom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 138(1): 65-70.
- Regel, R. H., Brookes, J. D., Ganf, G. G. & Griffiths, R. W. (2004). The influence of experimentally generated turbulence on the Mash01 unicellular *Microcystis aeruginosa* strain. *Hydrobiologia*. 517: 107-120.
- Rodolfi, L., Chini, Z. G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. & Tredici,

- M. (2009) Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 102(1): 100-112.
- Ruíz Montes, A. M. (2010). Evaluación de la exposición de bisfenol-A en población infantil de la provincia de Granada e identificación de factores asociados. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
 - Satyanarayana, K. G., Mariano, A. B. & Vargas, J. V. C. (2011). A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *International Journal of Energy Research*. 35: 291–311.
 - Schnüner, J. & Rosswall, T. (1982). Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology*. 43: 1256-1261
 - Staples, C., Dome, P. & Kclecka, G. (1998) A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*. 36(10): 2149-2173.
 - Strom, D., Ralph, P. J. & Strauber, J. L. (2009). Development of a toxicity identification evaluation protocol using chlorophyll-a fluorescence in a marine microalga. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 56: 30-38
 - Sun, Y., Wada, M., Al-Dirbashi, O., Kuroda, N., Nakazawa, H. & Nakashima, K. (2000). High-performance liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection of bisphenol A migrated from polycarbonate baby bottles using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl) benzoyl chlorine as a label. *Journal of Chromatography B*. 749: 49-56.
 - Ulloa Mercado, R. G. (2011). Inducción de productos bioactivos en la microalga marina *Tetraselmis suecica*. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
 - Van Wezel, A. P. & van Vlaardingen, P. (2004). Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquatic Toxicology*. 66: 178-189.
 - Walsh, G. E., Deans, C. H. & McLaughlin, M. J., (1987). Comparations of the EC50s of algal toxicity test calculated by four methods. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 6: 767-770
 - Welshons, W. V., Nagel, S. C. & vom Saal, F. S. (2006). Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at level of human exposure. *Endocrinology* 147: 56-69.
 - Welshons, W. V., Thayer, K. A., Judy, B. M., Taylor, J. A., Curran, E. M. & vom Saal, F. S. (2003). Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine- disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environmental Health Perspectives*. 111(8): 994-1006.
 - Zafra Gómez, M. (2001) Caracterización y determinación de bisfenol A y compuestos relacionados en muestras ambientales y fluidos biológicos por espectrofluorometría y cromatografía de gases-espectrometría de masas. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
 - Zhang, W., Xiong, B., Sun, W. & An, S. (2012). Acute and chronic toxic effects of bisphenol A on *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Environmental*. 714-722.