

UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

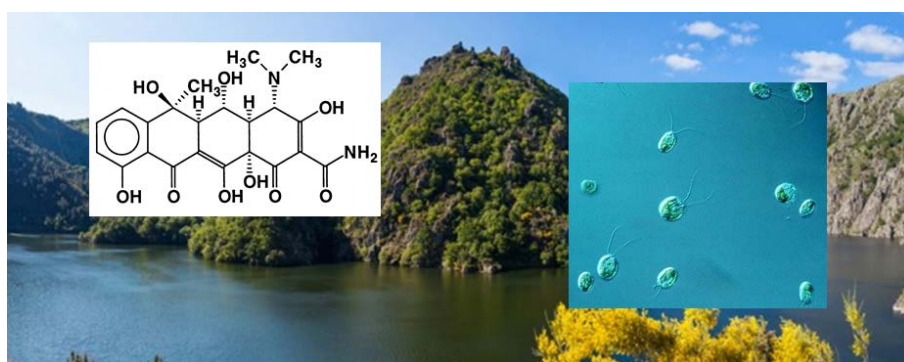
Departamento de Biología Celular y Molecular

Área de Microbiología

Efecto del antibiótico oxitetraciclina, un microcontaminante acuático emergente, sobre la microalga dulceacuática *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard.

Efecto do antibiótico oxitetraciclina, un microcontaminante acuático emerxente, sobre a microalga doceacuática *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard.

Effect of antibiotic oxytetracycline, an emergent aquatic micropollutant, on the freshwater microalga *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard.



Kelly Conde Pérez

A Coruña, julio de 2016

Dirigido por la Dra. Carmen Rioboo Blanco





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología Celular y Molecular**

**Área de Microbiología**

## TRABAJO DE FIN DE GRADO

Dña. Carmen Rioboo Blanco autoriza la presentación del Trabajo de Fin de Grado “Efecto del antibiótico oxitetraciclina, un microcontaminante acuático emergente, sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard” presentado por Kelly Conde Pérez para su defensa ante el tribunal calificador.

En A Coruña, a 21 de julio de 2016

Carmen Rioboo 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 Universidade da Coruña, bajo la dirección de la Dra. Carmen Rioboo Blanco, Profesora Contratada Doctor Interina de Universidad de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña.



# Índice

|   |    |
|---|----|
| 1. Resumen/Resumo/Abstract.....   | 7  |
| 2. Introducción.....  | 10 |
| 3. Objetivo.....  | 11 |
| 4. Material y métodos .....   | 12 |
| 4.1 Descripción de la especie .....   | 12 |
| 4.2 Cultivo microalgal .....  | 13 |
| 4.3 Oxitetraciclina.....  | 13 |
| 4.4 Diseño experimental .....   | 14 |
| 4.5 Determinación de la densidad celular .....  | 15 |
| 4.6 Análisis de viabilidad celular .....  | 15 |
| 4.7 Cálculo de la Concentración Inhibitoria Media, IC <sub>50</sub> .....                 | 16 |
| 4.8 Determinación del peso seco celular .....   | 17 |
| 4.9 Determinación espectrofotométrica del pigmento fotosintético clorofila <i>a</i> ..... | 17 |
| 4.10 Análisis estadístico .....   | 18 |
| 5. Resultados y discusión.....  | 18 |
| 5.1 Crecimiento .....   | 18 |
| 5.2 Viabilidad celular .....  | 22 |
| 5.3 Contenido celular del pigmento fotosintético clorofila <i>a</i> .....                 | 24 |
| 5.4 Peso seco celular.....  | 26 |
| 6. Conclusiones/ Conclusións/Conclusions.....   | 28 |
| 7. Bibliografía.....  | 30 |
| Abreviaturas.....   | 35 |





## 1. Resumen/Resumo/Abstract

Los contaminantes emergentes, entre los que se encuentran los compuestos farmacéuticos, constituyen un peligro latente en los ecosistemas acuáticos, ya que su presencia en estos medios puede provocar impactos negativos directos o indirectos sobre la biota, siendo particularmente preocupante un potencial efecto tóxico sobre las microalgas, organismos de gran relevancia para los ecosistemas, donde contribuyen al balance de oxígeno y gracias a las cuales se inicia el flujo de energía en los mismos. En la actualidad, el antibiótico oxitetraciclina es uno de los fármacos más utilizados en múltiples sectores como la medicina, veterinaria, ganadería o piscicultura.

En este trabajo se estudió el posible efecto tóxico del contaminante emergente oxitetraciclina (OTC) sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii*. Los cultivos de *C. reinhardtii* se expusieron a diferentes concentraciones de oxitetraciclina (1; 2,5; 5; y 10 mg l<sup>-1</sup>) durante 24 h y se analizaron los parámetros de crecimiento, viabilidad celular, contenido celular del pigmento fotosintético clorofila *a* y peso seco celular frente a cultivos control sin antibiótico.

La exposición a oxitetraciclina provocó un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) del crecimiento y una pérdida de viabilidad celular en los cultivos de *C. reinhardtii* dependiente de la concentración de antibiótico, mientras que el contenido de clorofila *a* de las células microalgales sólo registró un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) en los cultivos expuestos a la concentración más alta ensayada. Por el contrario, el peso seco celular, presentó un incremento significativo ( $p < 0,05$ ), excepto en los cultivos con la menor concentración del antibiótico.

Paralelamente a estos ensayos, donde los cultivos se expusieron a una intensidad lumínica de 70  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , se llevaron a cabo cultivos con las mismas concentraciones de oxitetraciclina pero sometidos a un incremento en la intensidad lumínica, siendo expuestas a 200  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , con el fin de estudiar una potencial interacción entre la exposición al antibiótico y un incremento en la intensidad lumínica. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de un efecto antagonista entre ambos factores, observándose  $\text{IC}_{50}$  con valores superiores en los cultivos expuestos a 200  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  que en los expuestos a 70  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para los parámetros tasa de crecimiento y viabilidad celular.

**Palabras clave:** *Chlamydomonas reinhardtii*, microalga, contaminante emergente, oxitetraciclina, toxicidad, efecto antagónico.

Os contaminantes emerxentes, entre os cales se atopan os compostos farmacéuticos, constitúen un perigo latente nos ecosistemas acuáticos, xa que a súa presenza nestes medios pode provocar impactos negativos directos ou indirectos sobre a biota, sendo particularmente preocupante un potencial efecto tóxico sobre as microalgas, organismos de grande relevancia para os ecosistemas, onde contribúen ó balance de osíxeno e grazas as cales se desencadea o fluxo de enerxía nos mesmo. Na actualidade, o antibiótico oxitetraciclina é un dos fármacos máis empregados en múltiples sectores como na medicina, veterinaria, gandería ou piscicultura.

Neste traballo estudouse o posible efecto tóxico do contaminante emerxente oxitetraciclina (OTC) sobre a microalga doceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii*. Os cultivos de *C. reinhardtii* expuxéronse a diferentes concentración de oxitetraciclina (1; 2,5; 5; y 10 mg l<sup>-1</sup>) durante 24 h e tamén se analizaron os parámetros de crecemento, viabilidade celular, contido celular do pigmento fotosintético clorofila *a* e o peso seco celular fronte ós cultivos control sen antibiótico.

A exposición a oxitetraciclina provocou un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) do crecemento e unha perda da viabilidade celular nos cultivos de *C. reinhardtii* dependente da concentración do antibiótico, mentras que o contido de clorofila *a* das células microalgales só rexistraron un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) nos cultivos expostos á concentración máis alta ensaiada. Pola contra, o peso seco celular, presentou un incremento significativo ( $p < 0,05$ ), exceptuando o cultivo coa maior concentración de antibiótico.

Paralelamente a estos ensaios, onde os cultivos se someteron a unha intensidade lumínica de 70  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , leváronse a cabo cultivos coas mesmas concentracións de oxitetraciclina pero sometidos a un incremento na intensidade lumínica, sendo expostos a 200  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , co fin de estudar unha potencial interacción entre a exposición ó antibiótico e un incremento da intensidade lumínica. Os resultados obtidos suxeren a existencia dun efecto antagonista entre ambos factores, observándose IC<sub>50</sub> con valores superiores nos cultivos expostos a 200  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  que nos expostos a 70  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para os parámetros taxa de crecemento e viabilidade celular.

**Palabras clave:** *Chlamydomonas reinhardtii*, microalga, contaminante emerxente, oxitetraciclina, toxicidade, efecto antagónico.

Emerging contaminants, such as pharmaceutical compounds constitute a latent danger in aquatic ecosystems, as their presence in these media may cause direct or indirect negative impacts on biota. This toxic potential effect is particularly worrying microalgae, organisms of great importance into aquatic ecosystems, since they are the beginning of the energy flow and contribute to oxygen balance and through. Nowadays the antibiotic oxytetracycline is one of the most used in multiple sectors as in medicine, veterinary, livestock or pisciculture.

In this study the possible toxic effect of emerging pollutant oxytetracycline (OTC) on freshwater microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* was studied. *C. reinhardtii* cultures were exposed to different concentrations of oxytetracycline (1, 2.5, 5, and 10 mg l<sup>-1</sup>) for 24 h and parameters of growth, cell viability, cell contents of photosynthetic pigment chlorophyll a, weight dry cell were analyzed versus control cultures without antibiotic.

Oxytetracycline exposure caused a significant decrease (p <0.05) of growth and the loss of cell viability in cultures of *C. reinhardtii* concentration dependent antibiotic, while the chlorophyll a content of microalgal cells only recorded a significant decrease (p <0.05) in cultures exposed to the highest concentration tested. In contrast, cell dry weight showed a significant increase (p <0.05), except in cultures with the lowest concentration of antibiotic.

In parallel to these previous described assays, where the cultures were exposed at a light intensity of 70  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , cultures with the same concentrations of oxytetracycline but exposed to an increasingly light intensity were carried out. These cultures were exposed to 200  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , in order to study a potential interaction between antibiotic exposure and an increase in light intensity. The results suggest the existence of an antagonistic effect between the two factors, showing IC<sub>50</sub> with higher values of growth rate and cell viability in cultures exposed to 200  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$  than in those exposed to 70  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

**Keywords:** *Chlamydomonas reinhardtii*, microalgae, emergent pollutant, oxytetracycline, toxicity, antagonistic effect.

## 2. Introducción

Hoy en día, la presencia de una amplia gama de contaminantes orgánicos e inorgánicos es controlada en los sistemas acuáticos por la Comisión Europea de Medio Ambiente (Directiva 2008/105/CE), pero el número de compuestos químicos existentes aumenta constantemente por el desarrollo de nuevas moléculas cuyo impacto medioambiental todavía se desconoce (Goldman, 2002). Estos contaminantes de aparición reciente se conocen con el nombre de contaminantes emergentes. Son compuestos de distinto origen y naturaleza química, de los cuales existe información limitada y que todavía no se encuentran regulados por los reglamentos de calidad de agua existentes actualmente, pudiendo ser amenazas potenciales para los ecosistemas y para la salud y seguridad humana (Farré *et al.*, 2008).

Dentro de los contaminantes emergentes se incluyen sustancias de uso diario en la sociedad moderna como fármacos, productos de higiene personal, cosméticos, hormonas, pesticidas, herbicidas y otros productos químicos industriales (Matamoros *et al.*, 2016). La liberación continuada de estas moléculas a las aguas dulces, en las cuales penetran fácilmente, puede llegar a causar efectos negativos sobre los organismos típicos de estos ecosistemas como ya se ha empezado a estudiar en las últimas décadas (Strom *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2013; Seoane *et al.*, 2014; Cheloni *et al.*, 2014; Moro *et al.*, 2014; Esperanza *et al.*, 2015).

Particularmente, los fármacos constituyen un grupo de compuestos cada vez más abundantes en los medios acuáticos. Esto se debe a la gran expansión de su utilización en medicina, veterinaria, ganadería, piscicultura, etc (Moro *et al.*, 2014). Los organismos que ingieren fármacos tienden a eliminar gran parte de los mismos por medio de las heces o la orina, acabando de manera indirecta o directa en hábitats acuáticos (Aguirre-Martínez *et al.*, 2015). Por ello, dichas descargas de fármacos en ambientes dulceacuícolas generan tiempos cortos de alta concentración que pueden ser suficientes para afectar a la mayor parte de la biota (Prado *et al.*, 2015).

La presencia de antibióticos en aguas dulces supone un serio problema, pues pueden dañar a microorganismos no diana. Los microorganismos no diana suelen desempeñar en el ecosistema funciones muy importantes: el ciclo de nutrientes, la mineralización de materia orgánica, la degradación de contaminantes y el balance de oxígeno (Näslund *et al.*, 2008; Vannini *et al.*, 2011). Los antibióticos pueden afectar a productores primarios como microalgas y cianobacterias que son especialmente vulnerables y constituyen la base de las cadenas tróficas, por lo que un efecto nocivo sobre ellas, puede afectar drásticamente a niveles tróficos superiores, modificando las comunidades y alterando el ecosistema

(Campanella *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2014; Rioboo *et al.*, 2007). Además, este grupo de microorganismos son muy importantes en ecotoxicología por su gran sensibilidad ante un amplio grupo de contaminantes, tanto orgánicos como inorgánicos (Ma *et al.*, 2006), respondiendo de forma rápida a cambios en el medio debido a su corto tiempo de generación (De Lorenzo *et al.*, 2002; Rioboo *et al.*, 2007). Por esto, los ensayos basados en la inhibición del crecimiento de microalgas como *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus subspicatus* están incluidos dentro de los bioensayos de toxicidad obligados para el registro de nuevos compuestos químicos tanto en la Unión Europea como en los Estados Unidos (ISO 8692, 2012). La microalga que se utilizará como organismo de ensayo en el presente trabajo es *Chlamydomonas reinhardtii*.

El fármaco oxitetraciclina (OTC), estudiado en el presente trabajo, es un antibiótico muy utilizado tanto en medicina como en veterinaria por ser muy económico. Así mismo, también es empleado como factor promotor del crecimiento en el cultivo de animales a niveles subterapéuticos. Este químico muestra actividad ante una amplia gama de bacterias tanto Gram + como Gram -, e incluso ante organismos como Clamidias, Micoplasmas, Rickettsias, protozoos y parásitos (Chopra y Roberts, 2001).

Otro aspecto a considerar sobre el potencial efecto de los contaminantes químicos en los ecosistemas acuáticos, son los factores ambientales, debido a los cambios que se están produciendo a nivel del planeta y, particularmente en los ecosistemas acuáticos, como la acidificación de los océanos, la subida de la temperatura media terrestre, el aumento de la salinidad en aguas continentales, etc (Korkaric *et al.*, 2015). Por ello, es de gran interés determinar la posible interacción que se producir, sinérgica o antagónica, entre los contaminantes y otros factores comunes de estrés ambiental, así como sus efectos sobre los organismos acuáticos (Crain *et al.*, 2008; Holmstrup *et al.*, 2010). Debido a que organismos fotosintéticos como las microalgas pueden verse afectados por un incremento de la intensidad lumínica, en el presente trabajo, también se estudian las potenciales interacciones que puedan establecerse entre este factor ambiental y los efectos tóxicos provocados por la exposición al antibiótico oxitetraciclina en la microalga *C. reinhardtii*.

### **3. Objetivo**

El objetivo general de este trabajo es evaluar el potencial efecto tóxico de un antibiótico de uso común en humanos y animales, la oxitetraciclina, sobre una microalga dulceacuícola, *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard, así como estudiar la potencial interacción entre los efectos provocados por la exposición al antibiótico oxitetraciclina y un incremento en la intensidad lumínica recibida en cultivos de esta microalga. Para ello se estudiarán los

siguientes parámetros: crecimiento celular, clorofila *a*, viabilidad celular, y peso seco celular.

#### 4. Material y métodos

##### 6.1 Descripción de la especie

La especie utilizada en este estudio fue *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard (Fig. 1). La cepa (CCAP 11/32A mt+) se ha obtenido de la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos (CCAP; *Culture Collection of Algae and Protozoa*) del Laboratorio Marino de Dunstaffnage (Escocia, Reino Unido). Se trata de un microalga verde dulceacuícola, perteneciente a la división Chlorophyta, clase Chlorophyceae, orden Volvocales, familia Chlamydomonaceae (Bold y Wynne, 1985).

Las células de *C. reinhardtii* suelen aparecer individualizadas, son esféricas, elipsoides, de 5-30 µm de longitud, con una pared delgada y lisa. Presentan dos flagelos iguales en la parte apical, cercanos, de longitud a veces mayor que la célula (Fig. 1). Los cloroplastos suelen tener forma de copa. Pueden tener o no pirenoides y también una mancha ocular en el medio, o en la parte anterior de la célula, más o menos grande y de forma diversa. Alrededor del núcleo suele encontrarse el aparato de Golgi y alrededor de este último podemos encontrar en algunos casos un sáculo de retículo endoplasmático que conecta con la membrana plasmática. Presenta una o dos vacuolas pulsátiles en la base de los flagelos y mitocondrias entre el cloroplasto y el plasmalema. Las células están rodeadas por pared compuesta solamente por glicoproteínas fibrosas, exceptuando la zona de los flagelos (Pérez Valcárcel, 2010). El género *Chlamydomonas* es muy amplio y abarca una gran cantidad de especies con una distribución amplísima (Bischoff, 1959; Pérez Valcárcel, 2010), apareciendo en aguas dulces, suelos y en aguas saladas.

*C. reinhardtii* es una microalga ampliamente utilizada en ensayos de laboratorio, siendo en muchos casos organismo modelo para la investigación sobre cuestiones fundamentales en biología celular y molecular además de actuar como un indicador biológico de contaminación en estudios de ecotoxicidad (McCormick y Cairns, 1994). Esto se debe fundamentalmente a que es una especie fácil de cultivar, haploide, y presenta un rápido crecimiento, reproduciéndose tanto sexual como asexualmente.

En este trabajo se utilizaron células de *Chlamydomonas reinhardtii* mating + para evitar la reproducción sexual.



**Fig. 1.** Célula de *Chlamydomonas reinhardtii*. La imagen fue tomada con un microscopio Nikon Eclipse E400. La barra indica 10  $\mu\text{m}$ .

### **6.2 Cultivo microalgal**

Los cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* se realizan en medio nutritivo de cultivo Bristol (Brown *et al.*, 1967) que se prepara en agua destilada y posteriormente se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 min. A este medio de macronutrientes se le añade, en condiciones de asepsia, 3 mg l<sup>-1</sup> de una solución *stock* de oligoelementos (Fábregas *et al.*, 1984), preparada con 0,5 g de Algal (Algal, Nutrición Avanzada S.A) en 100 ml de agua destilada que se mantiene a 4°C durante la duración de las experiencias.

Los cultivos *stock* de *C. reinhardtii* se realizan en botellas Pyrex de 500 ml con aireación a un flujo constante de 10 l min<sup>-1</sup> de aire atmosférico insuflado con un turbosoplador y filtrado mediante filtros Milipore FG de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro antes de la entrada del aire en el cultivo. La cámara de cultivo presenta condiciones controladas de luz y temperatura. La iluminación en condiciones de cultivo se lleva a cabo por medio de tubos fluorescentes Philips TDL de 36 W (70  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), con un ciclo de 24 h de períodos luz-oscuridad (12 h de luz- 12 h de oscuridad) para mantener los ritmos circadianos de las microalgas. La temperatura constante de la cámara es de 18±1°C.

En todas las experiencias, se parte de una densidad celular de 4 × 10<sup>5</sup> células ml<sup>-1</sup> a partir de un inóculo en fase exponencial.

### **6.3 Oxitetraciclina**

La Oxitetraciclina (C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>) fue descubierta en 1940 a partir de la bacteria *Streptomyces rimosus*, y pertenece a la familia de las Tetraciclinas, siendo la segunda en ser descubierta. Estos compuestos se caracterizan por una estructura particular de cinco anillos conjugados con un grupo funcional carboxilo (Fig. 2) (Mitscher, 1978). La molécula de tetraciclina tiene varios grupos iónicos funcionales inusuales, y la carga de la molécula

depende del pH de la solución. Las tetraciclinas son importantes agentes quelantes y sus propiedades antimicrobianas y farmacocinéticas están estrechamente relacionadas con la quelación de iones metálicos (Chopra y Roberts, 2001).

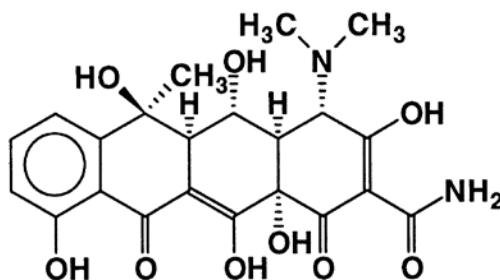


Fig. 2. Estructura molecular de la oxitetraciclina (Holten Lützhof et al., 1998)

La oxitetraciclina es un importante antibiótico de gran espectro debido a su actividad contra una amplia gama de infecciones. Las tetraciclinas constituyen una familia de antibióticos que inhiben la síntesis proteica evitando la unión del aminoacil-tRNA al dominio aceptor del ribosoma (sitio A) en la subunidad menor del ribosoma procariótico (30S) bloqueándose, de esta forma, el primer paso de la fase de elongación irreversiblemente (Pratt, 1981; Chopra y Roberts, 2001). Su absorción en el tracto gastrointestinal de cualquier animal es generalmente incompleta, de manera que gran parte del antibiótico ingerido se elimina por medio de las heces. Las moléculas de oxitetraciclina se distribuyen ampliamente por todo el cuerpo, penetrando en la mayoría de los fluidos corporales de manera muy eficaz (Murray *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se prepara la solución *stock* de este antibiótico a partir de oxitetraciclina en polvo comercializada por *Sigma Aldrich* (pureza > 95%), a una concentración de 5 g l<sup>-1</sup> en agua destilada. Ésta se mantiene a temperatura ambiente durante la duración de los ensayos.

#### 6.4 Diseño experimental

Con el objetivo de evaluar la potencial toxicidad del antibiótico oxitetraciclina sobre la microalga dulceacuícola *C. reinhardtii*, se realizan experiencias de 24 horas de duración donde cada ensayo se ha llevado a cabo dos veces de manera independiente. En todas las experiencias las concentraciones del antibiótico oxitetraciclina ensayadas son: 1 mg l<sup>-1</sup>, 2.5 mg l<sup>-1</sup>, 5 mg l<sup>-1</sup> y 10 mg l<sup>-1</sup>, además de cultivos control sin oxitetraciclina.

Los distintos cultivos se realizan en tubos *Afora* que contienen 60 ml de cultivo y se mantienen en las mismas condiciones de aireación, temperatura y fotoperiodo que las descritas previamente para los cultivos *stock*. En el primer bloque de ensayos, los cultivos



se mantienen bajo la misma condición de irradiancia que los cultivos *stock*, es decir, a 70  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . En un segundo grupo de ensayos, para estudiar la potencial interacción entre la exposición al contaminante y un incremento de la intensidad luminosa se llevaron a cabo cultivos en paralelo a los descritos, con la excepción de la exposición a una intensidad lumínica de 200  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . En el presente trabajo los cultivos expuestos a una intensidad lumínica estándar se referencian como cultivos expuestos a baja irradiancia (BI) y los cultivos expuestos a un incremento de la intensidad lumínica se referencian como cultivos expuestos a alta irradiancia (AI).

Todos los cultivos, incluido el control, se realizan por duplicado y los análisis de los diferentes parámetros estudiados (tasa de crecimiento, viabilidad celular, peso seco celular y contenido celular en clorofila *a*) se llevaron a cabo tras 24 horas de exposición a la oxitetraciclina.

### **6.5 Determinación de la densidad celular**

La densidad celular se analiza a 0 h y 24 h de exposición al antibiótico tomando alícuotas de los diferentes cultivos incluyendo tanto los controles como los cultivos expuestos a distintas concentraciones de oxitetraciclina.

Dado que *Chlamydomonas reinhardtii* posee flagelos, las células se fijan con lugol para evitar su movilidad. Tras ello, se utiliza la cámara para realizar el conteo en el microscopio óptico de contraste de fases NIKON Eclipse E400 (Nikon, Japón).

Una vez llevado a cabo el conteo se determinan las tasas de crecimiento ( $\mu$ ) mediante la fórmula:

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

donde  $\mu$  representa la tasa de crecimiento en días<sup>-1</sup>,  $N_t$  y  $N_0$  representan la densidad celular (cél ml<sup>-1</sup>) a tiempo de período estudiado y a tiempo inicial y  $t$  y  $t_0$  representan el tiempo inicial y el tiempo final del período estudiado, ambos expresados en días.

### **6.6 Análisis de viabilidad celular**

La viabilidad celular en cultivos de *C. reinhardtii* se analiza mediante el estudio de la hidrólisis enzimática del diacetato de fluoresceína (fluorescein diacetate o FDA) en las células microalgales. El FDA (3,6-diacetil-fluoresceína) es un compuesto fluorogénico formado por un anillo de fluoresceína unido a dos grupos acetato. Una vez añadido a la muestra, el FDA, que es un éster no polar, no fluorescente y lipofílico, penetra libremente en las células donde las esterasas citoplasmáticas no específicas hidrolizan los enlaces

éster de la molécula de FDA. Esto provoca que el diacetato de fluoresceína pierda los residuos acetato. La fluoresceína, ahora libre, es una molécula polar, hidrofílica, que emite fluorescencia en el espectro del verde (540 nm) cuando es excitada con luz azul (490 nm), y es retenida por las células cuando la membrana plasmática no se encuentra alterada.

En base a esto, la ausencia de fluorescencia verde propia de la fluoresceína puede relacionarse con la pérdida de viabilidad celular, permitiendo distinguir entre células con fluorescencia metabólicamente activas (viables) y células no fluorescentes no activas metabólicamente (no viables).

Para realizar el análisis, se preparan suspensiones celulares de cada tratamiento a densidad celular final de  $400 \times 10^6$  células  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> en tampón fosfato salino (PBS) estéril. Estas muestras se incuban en presencia de una concentración final de FDA de 0,4 g  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>, a partir de una solución concentrada de DMSO (dimetil sulfóxido) guardada a -20°C e incubando durante 5 minutos en oscuridad. Transcurrido el tiempo indicado, la fluorescencia se detecta por medio del microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 equipado con una lámpara de mercurio, utilizando un filtro de excitación entre 450-490 nm de longitud de onda y un filtro barrera LP (*Long-Pass*) de 520 nm de longitud de onda. El resultado se expresa en porcentaje (%) de células viables frente al total de células analizadas.

### **6.7 Cálculo de la Concentración Inhibitoria Media, IC<sub>50</sub>**

El cálculo de la Concentración Inhibitoria Media (*Inhibitory Concentration* 50%, IC<sub>50</sub>) se realiza para los parámetros de crecimiento y viabilidad celular en este trabajo. Este término se refiere a la concentración de la sustancia ensayada (en este caso el antibiótico oxitetraciclina), necesaria para provocar una inhibición del 50% en la respuesta del parámetro estudiado. Este valor se obtiene por interpolación gráfica en las curvas de concentración-respuesta (Walsh *et al.*, 1987), donde en el eje de abscisas se sitúa las concentraciones de antibiótico empleadas y en el eje de ordenadas el porcentaje de inhibición del parámetro estudiado en los cultivos expuestos a la oxitetraciclina.

Dicho porcentaje de inhibición se calcula a partir de los datos obtenidos en los parámetros de crecimiento y viabilidad celular para cada uno de los tratamientos con respecto al cultivo control utilizando la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[ \frac{(\text{Control} - \text{Tratamiento})}{\text{Control}} \right] \times 100$$

Los datos para el cálculo de las distintas IC<sub>50</sub> se ajustaron mediante una regresión no lineal aplicando un modelo sigmoideal de tres parámetros utilizando el paquete de análisis estadístico y de gráficas avanzadas Sigma Plot versión 12.0 (Systat Software Inc., Chicago).

### **6.8 Determinación del peso seco celular**

El peso seco celular se determina filtrando volúmenes ajustados, según la densidad celular correspondiente del día del ensayo, con el sistema multifilter *Millipore Corporation* y utilizando filtros de microfibras de vidrio previamente secados y tarados. Una vez realizada la filtración, los filtros se secan en la estufa a 55°C hasta obtener un peso constante. La manipulación de los filtros se lleva a cabo en todo momento con pinzas.

### **6.9 Determinación espectrofotométrica del pigmento fotosintético clorofila *a***

Las células de *C. reinhardtii* se recogen por centrifugación a partir de un volumen determinado de cada cultivo expuesto a las distintas concentraciones de antibiótico, incluyendo los cultivos control. La centrifugación se lleva a cabo en una centrífuga con refrigeración *Multifuge 3L-R Heraeus* a 4000 rpm durante un período de 10 min a 4°C. Una vez centrifugadas las muestras, la biomasa microalgal se resuspende en un volumen conocido de acetona al 90%. Las distintas muestras se mantienen bajo refrigeración en la nevera a 4°C envueltas en papel de aluminio para mantener condiciones de oscuridad durante 24 horas hasta que la extracción sea completa.

Además, las muestras se sonicán para provocar la ruptura celular por ultrasonidos de manera que el contenido celular se libere al medio externo. La sonicación se lleva a cabo manteniendo unas condiciones de baja temperatura y se realiza durante 1 min por muestra y siguiendo un período de 5 ciclos por muestra. El sonicador utilizado es *Sartorius stedim LABSONIC P*. Antes de hacer las lecturas de las absorbancias, las muestras se centrifugan de nuevo, bajo las mismas condiciones, para retirar los restos celulares. Tras ello se recoge el sobrenadante resultante, que contendrá el pigmento de interés, y se realizan lecturas de absorbancia a diferentes longitudes de onda apropiadas para el presente estudio: 664 y 647 nm en un espectrofotómetro *Shimadzu UV-160A*, frente a un blanco de acetona al 90%.

Por último, las concentraciones de clorofila *a* se calculan utilizando la siguiente ecuación para este pigmento de Jeffrey y Humphrey (1975):

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

donde [Clorofila a] representa la concentración de este pigmento expresada en  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de extracto, y  $A_{664}$ ,  $A_{647}$  se corresponden con las absorbancias medidas a una longitud de onda de 664 nm y 647 nm respectivamente.

### **6.10 Análisis estadístico**

Para todos los parámetros analizados (tasa de crecimiento, contenido en clorofila *a*, peso seco y viabilidad celular) se calculan las medias y las desviaciones estándar de las réplicas en cada tratamiento y de los controles. Los datos obtenidos se analizan estadísticamente mediante el estudio de la varianza (ANOVA) unifactorial, con el software IBM SPSS Statistics (versión 21.0, SPSS, IBM). La hipótesis de “la concentración de oxitetraciclina (OTC) del medio no afecta al parámetro estudiado” se valora con un nivel de confianza del 95%. A continuación, el test de Duncan se aplica con un nivel de significación (p-valor) del 0,05 en todos los casos para comparar las distintas medias y generar subconjuntos de datos de elevada similitud y así analizar de qué forma afecta cada concentración de oxitetraciclina al parámetro en cuestión.

Por otra parte se analizaron los datos mediante el estudio de la varianza (ANOVA) multifactorial con el mismo software que en el caso anterior, para estudiar las potenciales interacciones causadas por la combinación de dos factores, la exposición a la oxitetraciclina y el aumento de la intensidad luminosa sobre *C. reinhardtii*. La hipótesis que “no existe interacción entre la concentración de oxitetraciclina y el incremento de la irradiancia” se valora con un nivel de confianza del 95%.

Las gráficas se realizaron en todos los casos utilizando el paquete estadístico y de gráficas avanzadas SigmaPlot 12.0, representando los resultados como medias con su respectiva desviación estándar (sd).

## **5. Resultados y discusión**

### **7.1 Crecimiento**

Con el objetivo de determinar el potencial efecto tóxico del antibiótico oxitetraciclina sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii*, uno de los parámetros estudiados es el crecimiento. Pese a que, debido a los últimos avances tecnológicos en el campo de la ecotoxicología, se están desarrollando nuevos métodos y parámetros cada vez más útiles y más rápidos, la determinación del número de células o la densidad celular, junto con el cálculo de la tasa de crecimiento celular, sigue siendo un parámetro básico

analizado en cualquier ensayo de ecotoxicidad con la finalidad de determinar la toxicidad de un compuesto químico sobre un microorganismo (Van Wezel y Van Vlaardingen, 2004).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los tratamientos con distintas concentraciones de oxitetraciclina inducen un efecto inhibitorio significativo ( $p < 0,05$ ) sobre la tasa de crecimiento de la microalga dulceacuícola *C. reinhardtii* tras 24 horas de exposición al contaminante, tal como se refleja en la Tabla I.

**Tabla I.** Tasas de crecimiento obtenidas en los cultivos de *C. reinhardtii* expuestos durante 24 horas a diferentes concentraciones de oxitetraciclina en condiciones de baja y alta irradiancia.

| Oxitetraciclina<br>(mg l <sup>-1</sup> ) | Baja irradiancia                                      | Alta irradiancia                                      |
|--|---|---|
|  | Tasa de crecimiento<br>( $\mu$ ) (día <sup>-1</sup> ) | Tasa de crecimiento<br>( $\mu$ ) (día <sup>-1</sup> ) |
| <b>Control</b>                           | 0,58 ± 0,13 <sup>a</sup>                              | 1,07 ± 0,04 <sup>a</sup>                              |
| <b>1</b>                                 | 0,05 ± 0,04 <sup>b</sup>                              | 0,67 ± 0,04 <sup>b</sup>                              |
| <b>2,5</b>                               | 0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>                              | 0,00 ± 0,00 <sup>c</sup>                              |
| <b>5</b>                                 | 0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>                              | 0,00 ± 0,00 <sup>c</sup>                              |
| <b>10</b>                                | 0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>                              | 0,00 ± 0,00 <sup>c</sup>                              |

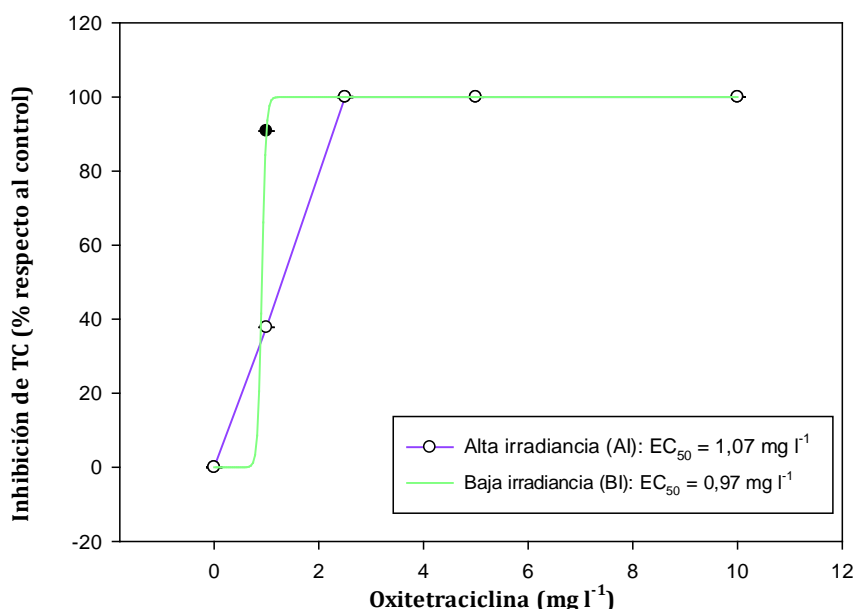
Los datos representan los valores medios de los cultivos ± la desviación estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado ( $p < 0,05$ ).

En los cultivos de *C. reinhardtii* sometidos a 70  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , la tasa de crecimiento disminuye significativamente ( $p < 0,05$ ) en la concentración de oxitetraciclina más baja ensayada (1 mg l<sup>-1</sup>), alcanzando un valor medio de 0,05 día<sup>-1</sup> que contrasta con el valor medio del control de 0,58 día<sup>-1</sup> (Tabla I) y produciéndose además, un descenso en la tasa de crecimiento dependiente de la concentración de antibiótico. Es decir, a medida que aumenta la concentración de oxitetraciclina en los cultivos de *C. reinhardtii*, la tasa de crecimiento desciende (Tabla I). Este mismo fenómeno se ha observado en otras especies de microalgas como *Tetraselmis suecica* (Seoane *et al.*, 2014) o en *Tetraselmis chuii* (Ferreira *et al.*, 2007) en la que se produce una reducción significativa del crecimiento a concentraciones de oxitetraciclina iguales o superiores a 5,3 mg l<sup>-1</sup>. Otros antibióticos como el cloranfenicol y el florfernicol también producen el mismo efecto dependiente de concentración sobre el crecimiento en *Tetraselmis suecica* (Seoane *et al.*, 2014) lo que coincide con lo observado para la oxitetraciclina en *C. reinhardtii* en el presente estudio.

Esta respuesta dependiente de concentración puede deberse a que, a partir de un determinado valor umbral, los mecanismos de defensa celular ya no son efectivos; de esta

forma, incrementos en la concentración del antibiótico provocan daños cada vez mayores sobre la tasa de crecimiento como ya se ha descrito en otros organismos acuáticos como *Chlorella sp.*, cultivada en presencia de los contaminantes acuáticos cobre y uranio (Franklin *et al.*, 2000).

Por otra parte, en los cultivos de *C. reinhardtii*, sometidos a condiciones de intensidad lumínica de  $70 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , la concentración de oxitetraciclina que produce un 50% de inhibición de la tasa de crecimiento celular ( $\text{IC}_{50}$ ) tras 24 h de exposición al contaminante presenta un valor  $0,97 \text{ mg l}^{-1}$  (Fig. 3). Este valor es inferior al descrito para la oxitetraciclina en otras microalgas acuáticas como es el caso de *Tetraselmis chuii* (Ferreira *et al.*, 2007) en la cual el  $\text{IC}_{50}$ , después de 72 horas de exposición a la oxitetraciclina, presenta un valor de  $11,18 \text{ mg l}^{-1}$ , así como en *Raphidocelis subcapitata* y *Rhodomonas salina* con valores de  $\text{IC}_{50}$  de 1,6 y  $4,5 \text{ mg l}^{-1}$ , respectivamente (Lützøft *et al.*, 1998) y de  $9,03 \text{ mg l}^{-1}$  en la microalga marina *Tetraselmis suecica* (Seoane *et al.*, 2014).



**Fig. 3.** Curvas de concentración-respuesta donde se representa el porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento (TC) de los cultivos de *C. reinhardtii* expuestos a diferentes concentraciones de oxitetraciclina con respecto a los cultivos control tras 24 horas de exposición al antibiótico.

Esto podría indicar que la microalga dulceacuícola *C. reinhardtii* es más sensible al antibiótico oxitetraciclina que el resto de microalgas citadas anteriormente, ya que se necesita una concentración menor del compuesto para causar una inhibición en la tasa de crecimiento celular del 50% con respecto a los cultivos control. Del mismo modo, un valor superior de  $\text{IC}_{50}$  en microalgas marinas como *Tetraselmis chuii*, *Tetraselmis suecica*, *Raphidocelis subcapitata* y *Rhodomonas salina*, con respecto al valor obtenido en el presente estudio para la microalga dulceacuícola *C. reinhardtii*, podría estar relacionado con el descenso de la biodisponibilidad de la oxitetraciclina por la mayor concentración en

agua de mar de iones di y trivalentes que producirán la quelación de la oxitetraciclina, lo que explicaría la reducción de su efecto tóxico sobre estos organismos acuáticos (Halling-Sorensen *et al.*, 2002).

La Directiva 93/67/CEE de la Unión Europea (*Commission of the European Communities*, 1996) clasifica compuestos químicos en diferentes categorías de riesgo ecológico acorde al valor de la concentración de compuesto ensayado que produce la inhibición del 50% en la tasa de crecimiento celular con respecto al control ( $IC_{50}$ ). Una  $IC_{50}$  de  $< 1 \text{ mg l}^{-1}$  clasifica la sustancia en cuestión como “muy tóxica para los organismos acuáticos”; de 1 a  $10 \text{ mg l}^{-1}$  se considera “tóxica para los organismos acuáticos”, y de 11 a  $100 \text{ mg l}^{-1}$  “dañina para los organismos acuáticos”. Sustancias con  $IC_{50} > 100 \text{ mg l}^{-1}$  no entrarían dentro de esta clasificación. Atendiendo a esta clasificación, con un valor de  $0,97 \text{ mg l}^{-1}$  (Fig. 3), la oxitetraciclina se clasificaría como muy tóxica para los ecosistemas acuáticos.

En un bloque de ensayos paralelo, donde los cultivos de *C. reinhardtii* fueron expuestos a  $200 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , el antibiótico oxitetraciclina también produce un efecto inhibitorio significativo ( $p < 0,05$ ) a partir de una concentración igual o mayor que  $1 \text{ mg l}^{-1}$  sobre la tasa de crecimiento celular (Tabla I). De una forma similar, en la bacteria *E. coli*, expuesta a condiciones de incremento de luminosidad en presencia de diferentes clases de tetraciclinas, también se ha observado una inhibición del crecimiento celular, hecho que podría deberse a la formación de iones superóxido durante el proceso de fotooxidación de las tetraciclinas (Martin *et al.*, 1986).

Así mismo, tras la realización de los análisis estadísticos correspondientes, en el presente estudio se observa una interacción significativa (ANOVA multifactorial,  $p < 0,05$ ) entre el aumento de la intensidad lumínica y la presencia del antibiótico oxitetraciclina en *C. reinhardtii*. El valor de  $IC_{50}$  obtenido para el crecimiento tras 24 h de exposición al tóxico, es  $1,07 \text{ mg l}^{-1}$  en los cultivos sometidos a  $200 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de iluminación, un valor mayor que el obtenido en los ensayos a  $70 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Fig. 3) lo que parece indicar que el efecto negativo de la oxitetraciclina sobre el crecimiento de la microalga *C. reinhardtii* se reduce al incrementar la intensidad lumínica.

Estos resultados podrían explicarse según la existencia de un efecto antagónico, ya que es necesaria una mayor concentración del antibiótico oxitetraciclina para producir una inhibición de la tasa de crecimiento del 50% en *C. reinhardtii* si esta se somete a condiciones de elevada intensidad lumínica. En esta microalga, ya se han estudiado interacciones sinérgicas entre moléculas como nanopartículas de óxido de cobre y el incremento de la intensidad lumínica, de manera que la combinación de un aumento de la irradiancia y el compuesto químico citado, provoca una inhibición significativa del

crecimiento junto con el incremento en el porcentaje de células que experimentan estrés oxidativo (Cheloni *et al.*, 2015) lo que contrasta con los resultados obtenidos con el antibiótico oxitetraciclina en el presente estudio. Sin embargo, la exposición de *C. reinhardtii* a cobre combinado con un incremento en la intensidad lumínica, parece mostrar una interacción antagonista (Cheloni *et al.*, 2014), lo que coincide con el presente trabajo.

## 7.2 Viabilidad celular

La actividad enzimática inespecífica celular constituye un indicador rápido y fiable de estrés (Blaise y Ménard, 1998). En concreto la actividad esterasa, analizada mediante FDA, está directamente relacionada con el metabolismo celular (Dorsey *et al.*, 1989; Regel *et al.*, 2002; Regel *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2011) por lo que se utiliza en numerosos ensayos de viabilidad celular en distintos tipos celulares (Adam y Duncan, 2001).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los tratamientos con distintas concentraciones de oxitetraciclina inducen un efecto inhibitorio significativo ( $p < 0,05$ ) sobre la viabilidad celular de la microalga dulceacuícola *C. reinhardtii* tras 24 horas de exposición al contaminante, tal como se refleja en la Tabla II.

**Tabla II.** Efecto de la oxitetraciclina en la viabilidad de las células de *C. reinhardtii* tras 24 horas de exposición a baja y a alta irradiancia.

| Oxitetraciclina<br>(mg l <sup>-1</sup> ) | Baja irradiancia                     | Alta irradiancia                     |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
|  | % viabilidad<br>(día <sup>-1</sup> ) | % viabilidad<br>(día <sup>-1</sup> ) |
| Control                                  | 95,56 ± 4,28 <sup>a</sup>            | 97,27 ± 1,58 <sup>a</sup>            |
| 1  | 90,76 ± 1,08 <sup>a</sup>            | 89,45 ± 1,58 <sup>b</sup>            |
| 2,5                                      | 71,31 ± 2 <sup>b</sup>               | 82,84 ± 1 <sup>b</sup>               |
| 5  | 66,36 ± 11,73 <sup>b</sup>           | 62,86 ± 4,04 <sup>c</sup>            |
| 10                                       | 54,41 ± 12,38 <sup>b</sup>           | 43,05 ± 0,27 <sup>d</sup>            |

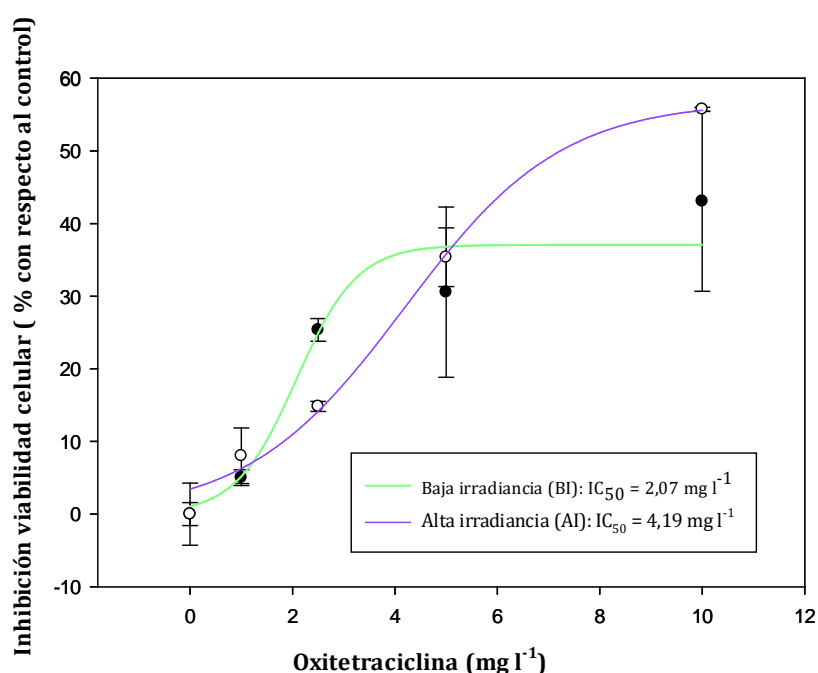
Los valores mostrados corresponden a la media de los cultivos ± la desviación estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado ( $p < 0,05$ ).

En primer lugar, las células de *C. reinhardtii*, tras 24 horas de exposición a la oxitetraciclina y en condiciones de iluminación de 70  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , experimentan una pérdida de viabilidad de forma inversamente proporcional a la concentración de oxitetraciclina en los cultivos (Tabla II). Este descenso es estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) a partir de una concentración de oxitetraciclina igual o superior a 2,5 mg l<sup>-1</sup>, alcanzando para este tratamiento un valor de porcentaje de viabilidad celular del 71,31%, a diferencia del tratamiento control que presenta un porcentaje de viabilidad celular próximo al 100% (95,56%). Estos resultados no coinciden con los observados en otros



ensayos con otras especies de microalgas (Seoane *et al.*, 2014), en los cuales la viabilidad celular, transcurridas 24 horas de exposición al antibiótico, no se veía afectada. En comparación, otros estudios mostraron que contaminantes como el cobre o algunos pesticidas dañaban la integridad de las membranas plasmáticas de las microalgas provocando un incremento de las células no viables con respecto al total de células analizadas (Cid *et al.*, 1996b; Lage *et al.*, 2001; Prado *et al.*, 2009a).

En estos ensayos de irradiancia estándar ( $70 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), la concentración de oxitetraciclina necesaria para que se produzca la inhibición de la viabilidad celular en un 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) tras 24 horas de exposición al antibiótico toma un valor de  $2,07 \text{ mg l}^{-1}$  tal y como se indica en la Figura 4.



**Fig. 4.** Curvas de concentración-respuesta donde se representa el porcentaje de inhibición de la tasa de la viabilidad celular de los cultivos de *C. reinhardtii* expuestos a diferentes concentraciones de oxitetraciclina con respecto a los cultivos control tras 24 horas de exposición al antibiótico.

En segundo lugar, los resultados de los ensayos en los que se incrementa la intensidad lumínica ( $200 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) muestran que la viabilidad de las células de *C. reinhardtii* desciende significativamente ( $p < 0.05$ ) a partir de la concentración de antibiótico más baja ensayada:  $1 \text{ mg l}^{-1}$  (Tabla II), menor que la concentración a partir de la cual descendía el porcentaje de viabilidad celular en el caso de los cultivos bajo condiciones estándar de intensidad lumínica. Para este tratamiento se alcanza un valor de porcentaje de viabilidad celular medio del 89,45% que difiere significativamente ( $p < 0,05$ ) del valor medio que se registró en el control (97,27%).

Además, los análisis estadísticos correspondientes muestran la existencia de una interacción significativa (ANOVA multifactorial,  $p < 0,05$ ) entre el aumento de la

intensidad luminosa y el antibiótico oxitetraciclina sobre el parámetro viabilidad, lo que indica que el aumento de la intensidad lumínica influye en el efecto tóxico de la oxitetraciclina sobre la viabilidad celular en la microalga dulceacuícola *C. reinhardtii*.

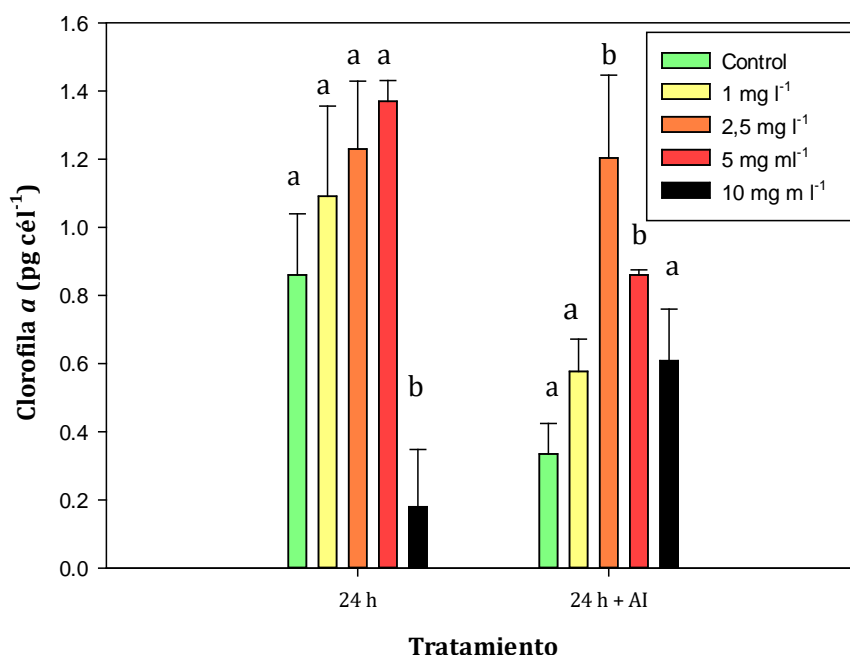
El valor de IC<sub>50</sub> obtenido para la viabilidad celular en los ensayos de irradiancia a 200  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , tras 24 horas de exposición al contaminante de 4,19  $\text{mg l}^{-1}$  (Fig. 4), valor mayor que el obtenido en los ensayos bajo condiciones de 70  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , lo que indicaría de nuevo un potencial efecto antagónico entre la oxitetraciclina y el factor incremento de la intensidad lumínica, como ya se apuntó tras los análisis de las tasas de crecimiento de *C. reinhardtii*.

### **7.3 Contenido celular del pigmento fotosintético clorofila a**

En muchos estudios de toxicidad, los marcadores bioquímicos o biomarcadores, ofrecen una información a través del análisis de la concentración intracelular de determinados compuestos que se modulan en respuesta a una condición de estrés. Además, los marcadores bioquímicos se caracterizan por presentar una respuesta rápida al estrés lo que puede ocurrir antes de que se puedan apreciar efectos a nivel poblacional. Por eso, estas moléculas son actualmente muy utilizadas en ensayos ecotoxicológicos (Couderchet y Vernet, 2003; Banni *et al.*, 2005; Jammers *et al.*, 2009). El contenido intracelular de pigmentos constituye actualmente un biomarcador de exposición a diversas sustancias tóxicas en microalgas (Couderchet y Vernet, 2003) que resulta interesante valorar en trabajos como el presente.

Algunos autores han propuesto el contenido en clorofilas *a* y *b* como el índice ideal para evaluar el efecto de los agentes tóxicos por sus implicaciones sobre las tasas de fotosíntesis y respiración de las microalgas (Xu *et al.*, 2013), por lo que en algunos trabajos el contenido celular en clorofila *a* se utiliza como estimación del crecimiento microalgal (Debenest *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los tratamientos con distintas concentraciones de oxitetraciclina afectan significativamente ( $p < 0,05$ ) al contenido celular en clorofila *a* de la microalga dulceacuícola *C. reinhardtii* tras 24 horas de exposición al contaminante, tal y como se refleja en la Figura 4.



**Fig. 5.** Contenido celular en clorofila *a*, en cultivos de *C. reinhardtii* tras 24 horas de exposición al antibiótico oxitetraciclina a baja y a alta irradiancia. Los datos mostrados se corresponden con los valores medios de clorofila *a* de los cultivos  $\pm$  la desviación estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado ( $p < 0,05$ ).

En condiciones de intensidad lumínica estándar ( $70 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), tras 24 horas de exposición al compuesto, el contenido en clorofila *a* se ve significativamente afectado ( $p < 0.05$ ) a una concentración de  $10 \text{ mg l}^{-1}$ , la más alta ensayada, tomando un valor medio de  $0,18 \text{ pg cél}^{-1}$  en comparación con el valor medio del control que presenta una concentración celular de clorofila *a* de  $0,86 \text{ pg cél}^{-1}$  (Fig. 4). Por otra parte, en ensayos con *Tetraselmis suecica* expuesta a concentraciones crecientes de oxitetraciclina, también se ha observado como los cultivos expuestos al antibiótico mostraban un descenso en el contenido de clorofila *a* exceptuando el tratamiento de concentración  $2,5 \text{ mg l}^{-1}$  de oxitetraciclina (Seoane *et al.*, 2014).

En concreto, el antibiótico oxitetraciclina, objeto de estudio en este trabajo, actúa sobre la subunidad pequeña del ribosoma procariótico (30S). De esta forma, la toxicidad ejercida por algunos antibióticos sobre células eucarióticas, podría deberse, al menos en parte, a los elementos de origen procariota del metabolismo y reproducción de cloroplastos y mitocondrias, lo que hace que estos orgánulos puedan ser potenciales dianas de este antibiótico (McFadden y Roos, 1999; González-Pleiter *et al.*, 2013; Seoane *et al.*, 2014).

Paralelamente, bajo condiciones de mayor intensidad lumínica a  $200 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , tras 24 horas de exposición al contaminante, no se observan diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el contenido celular de clorofila *a* en la microalga *C. reinhardtii* con respecto al control en los cultivos con concentraciones del antibiótico de  $1 \text{ mg l}^{-1}$  y  $10 \text{ mg l}^{-1}$  como se

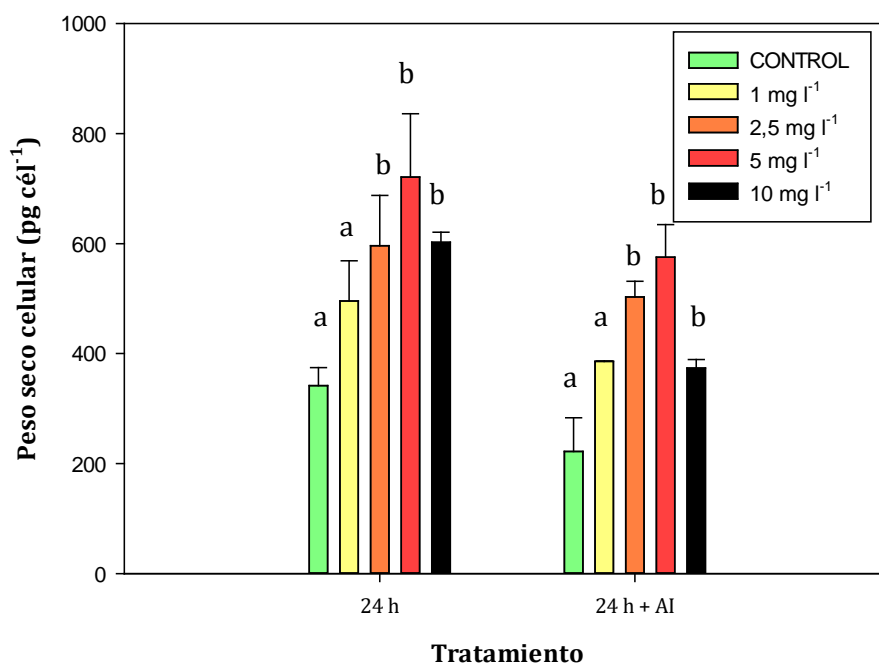
muestra en la Figura 4. Sin embargo, se observa un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la concentración del pigmento clorofila *a* en las células correspondientes a los cultivos de 2.5 mg l<sup>-1</sup> y 5 mg l<sup>-1</sup>, tomando valores medios de concentración intracelular de clorofila *a* de 1,20 pg cél<sup>-1</sup> y 0,86 pg cél<sup>-1</sup> en comparación con un valor medio del control de 0,33 pg cél<sup>-1</sup>.

El incremento de contenido de clorofilas por exposición a contaminantes ha sido descrito en otras especies de microalgas como *Chlamydomonas moewusii* (Prado *et al.*, 2009). Los fotosistemas celulares incrementan su actividad fotosintética en presencia de elevadas intensidades de luz para así deshacerse de la energía excesiva (Vass *et al.*, 1992), activando la síntesis de los componentes de los tilacoides, entre los que se encuentra la clorofila *a* en complejos proteicos de membrana (Tukaj *et al.*, 2003). Por tanto, en respuesta a la interacción combinada entre la exposición a la oxitetraciclina y a una elevada intensidad lumínica, las células de *C. reinhardtii* podrían estar incrementando su actividad metabólica para hacer frente al contaminante al cual están expuestas, lo que podría estar relacionado con el aumento en el contenido de clorofila *a* observado.

#### **7.4 Peso seco celular**

Al ser un parámetro íntimamente relacionado con la tasa de crecimiento celular y con el tamaño celular, el estudio del peso seco celular puede ser interesante en ensayos de ecotoxicidad con microorganismos. Por todo esto, el peso seco celular, ha sido uno de los cuatro parámetros evaluados en este trabajo.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los tratamientos con distintas concentraciones de oxitetraciclina inducen un efecto estimulador significativo ( $p < 0,05$ ) sobre el peso seco celular de la microalga dulceacuícola *C. reinhardtii* tras 24 horas de exposición al contaminante, tal y como se refleja en la Figura 5.



**Figura 5.** Peso seco celular, en cultivos de *C. reinhardtii* tras 24 horas de exposición al antibiótico oxitetraciclina a baja y a alta irradiancia. Los datos mostrados se corresponden con los valores medios de peso seco celular de los cultivos  $\pm$  la desviación estándar. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado ( $p < 0,05$ ).

Los análisis estadísticos llevados a cabo muestran que a  $70 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , tras 24 horas de exposición al contaminante, el peso seco celular en la microalga dulceacuícola *C. reinhardtii* aumenta significativamente ( $p < 0,05$ ) a partir de la concentración de oxitetraciclina más baja ensayada:  $1 \text{ mg l}^{-1}$ , alcanzando para el tratamiento de  $2,5 \text{ mg l}^{-1}$  un valor medio de peso seco celular de  $596,17 \text{ pg cél}^{-1}$ , con respecto al valor medio del control que se corresponde con  $341,75 \text{ pg cél}^{-1}$ . Así mismo, bajo condiciones de intensidad lumínica de  $200 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , tras 24 horas de exposición al contaminante, el peso seco celular aumenta significativamente ( $p < 0,05$ ) observándose diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0,05$ ) a partir de la concentración de oxitetraciclina correspondiente a  $1 \text{ mg l}^{-1}$  (Fig. 5).

Comparando estos resultados con los de tasa de crecimiento celular obtenidos, todo indica a que podría existir una relación entre la disminución significativa de la tasa de crecimiento y el aumento del peso seco celular en *C. reinhardtii*. Bajo esta hipótesis, las células expuestas al antibiótico oxitetraciclina incrementarían su tamaño con respecto a las células control, lo que explicaría el incremento del peso seco observado. Sin embargo, la exposición a la oxitetraciclina, provocaría que las células no pudieran completar el proceso de división celular, lo que explicaría la disminución dependiente de concentración de la tasa de crecimiento celular comentada anteriormente (Esperanza *et al.*, 2015).

Por otro lado, en estudios con otros organismos como la microalga marina *Tetraselmis suecica* con distintos antibióticos entre los que se encontraba la oxitetraciclina, se observó que éstos provocaban un descenso significativo del tamaño celular a medida que se incrementaba la concentración de antibiótico en los cultivos (Seoane *et al.*, 2014), hecho que contradice la explicación aportada en este trabajo a la luz del incremento del peso seco en la microalga *C. reinhardtii* expuesta a oxitetraciclina. Sin embargo, en ensayos de ecotoxicidad con la planta acuática *Lemna gibba*, se ha comprobado que las distintas tetraciclinas evaluadas presentaban una elevada fitotoxicidad sobre esta especie, con excepción del antibiótico oxitetraciclina, de manera que tras 56 días de exposición al mismo, el peso húmedo de esta planta se incrementaba con respecto al control para concentraciones de oxitetraciclina de 1 y 5 mg l<sup>-1</sup> (Brain *et al.*, 2004; Pietrini *et al.*, 2015).

Para este parámetro, los análisis estadísticos mostraron que no hay una interacción significativa (ANOVA multifactorial,  $p > 0.05$ ) entre la exposición a oxitetraciclina y el incremento de la intensidad lumínica tras 24 horas de exposición.

## **6. Conclusiones/ Conclusións/Conclusions**

El antibiótico oxitetraciclina provoca un descenso en la tasa de crecimiento y en el porcentaje de células viables en los cultivos de la microalga dulceacuícola *C. reinhardtii*. Esta inhibición en ambos parámetros es dependiente de la concentración del fármaco.

La concentración celular del pigmento fotosintético clorofila *a* se reduce a la concentración de oxitetraciclina más alta ensayada. Por otra parte, el peso seco celular aumenta a todas las concentraciones de oxitetraciclina ensayadas con respecto al control.

En los cultivos expuestos a 200  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , se observa un descenso en la toxicidad ejercida por la oxitetraciclina sobre la microalga *C. reinhardtii*, obteniéndose valores para la IC<sub>50</sub> superiores a los obtenidos en los cultivos a 70  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para los parámetros de tasa de crecimiento y viabilidad. Esto sugiere la existencia de una interacción de tipo antagónico en el efecto del antibiótico oxitetraciclina sobre *C. reinhardtii* al aumentar la intensidad lumínica recibida por los cultivos.

O antibiótico oxitetraciclina provoca un descenso na taxa de crecemento e no porcentaxe de células viables nos cultivos da microalga doceacuícola *C. reinhardtii*. Esta inhibición en ambos parámetros é dependente da concentración do fármaco.

A concentración celular do pigmento fotosintético clorofila *a* redúcese á concentración de oxitetraciclina máis alta ensaiada. Por outra parte, o peso seco celular aumenta a todas as concentracións de oxitetraciclina ensaiadas con respecto ó control.

Nos cultivos expostos a 200  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obsérvase un descenso na toxicidade exercida pola oxitetraciclina sobre a microalga *C. reinhardtii*, obténdose valores para a  $\text{IC}_{50}$  superiores ós obtidos nos cultivos a 70  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para os parámetros de taxa de crecemento e viabilidade. Este feito supón a existencia dunha interacción de tipo antagónico no efecto do antibiótico oxitetraciclina sobre *C. reinhardtii* ó aumentar a intensidade luminosa recibida polos cultivos.

The antibiotic oxytetracycline causes a decrease in the growth rate and in the percentage of viable cells in culture of freshwater microalgae *C. reinhardtii*. This inhibition is concentration-dependent in both parameters.

The cellular concentration of the chlorophyll is reduced in cultures with the highest oxytetracycline concentration tested. Moreover, the cell dry weight increases in all cultures exposed to oxytetracycline.

In cultures exposed to 200  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a decrease in the toxicity exerted by the oxytetracycline on *C. reinhardtii* is observed, obtaining higher values for the  $\text{IC}_{50}$  than those obtained in cultures to 70  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for the parameters growth rate and viability. These results implies the existence of an antagonistic interaction in the effect of antibiotic oxytetracycline on *C. reinhardtii* due to the increasing light intensity.

## 7. Bibliografía

- Adam G., Duncan H. (2001). Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 943-951.
- Aguirre-Martínez, G.V., Owuor, M.A., Garrido Pérez, C., Salamanca, M.J., Del Valls, T.A., Martín-Díaz, M.L. (2015). Are standard test sensitive enough to evaluate effects of human pharmaceuticals in aquatic biota? Facing changes in research approaches when performing risk assessment of drugs. *Chemosphere*. 120: 75-85.
- 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.
- Bischoff, W. H. (1959). Some observations on *Chlamydomonas microhalophila* sp. NOV. *Biological Buletin*. 117: 54-62.
- 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.
- Bold, H., Wynne, M. (1985). *Introduction to the Algae*. Prentice-Hall, New Jersey. 720 pp.
- Brain, R. A., Johnson, D. J., Richards, S. M., Sanderson, H., Sibley, P. K., Solomon, K. R. (2004). Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23 (2): 371-382.
- Brown, T. E., Richardson, F. L. & Vaughn, M. L. (1967). Development of red pigmentation in *Chlorococcum wimmeri* (Chlorophyta: Chlorococcales). *Phycologia* 6: 167-184.
- Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, M. P., Saoncella, A. (2001). An algal biosensor for the monitoring of wáter toxicity in estuarine enviroments. *Water Research*. 35: 69-76.
- Cheloni, G., Cosio, C., Slaveykova, V.I. (2014). Antagonistic and synergistic effects of light irradiation on the effects of copper on *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*. 155: 275-282
- Cheloni, G., Marti, E., Slaveykova, V.I. (2015) Interactive effects of copper oxide nanoparticles and light to green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*. 170: 120-128.
- Chopra, I. y Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of actions, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65(2): 232-260.
- Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C., Abalde, J., 1996b. Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry. *Cytometry*. 25 (1), 32-36.
- Couderchet, M. y Vernet, G. (2003). Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. *Ecotoxicology Environment Safety*. 55: 271-277.



- Crain, C. M., Kroeker K., Halpern, B. S. (2008). Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology Letters*. 11: 1304-1315
- De Lorenzo, M. E., Taylor, L.A., Lund, S. A., Pennington, P.L., Stroizer, D. E., Fulton, M.H. (2002). Toxicity and bioconcentration potencial of the agricultural pesticide endosulfan in phytoplankton and zooplankton. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 81: 159-167.
- Debenest, T., Gagne, F., Petit, A. N., Kohli, M., Eullafroy, P. y Blaise, C. (2010). Monitoring of a flame retardant (tetrabromobisphenol A) toxicity on different microalgae assessed by flow cytometry. *Journal of Environmental Monitoring*. 12: 1918-1923.
- Directiva 2008/105/CE. Proyecto de Real Decreto sobre las normas de calidad ambiental (NCA) en el ámbito de la política de aguas. DO L 348 de 24.12.2008
- 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.
- Engler, R. J. (2012). The Complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean. *Environmental Science and Technology*. 46: 12302-12315.
- Esperanza, M., Cid, Á., Herrero C., Rioboo, C. (2015) Acute effects of a prooxidant herbicide on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: Screening cytotoxicity and genotoxicity endpoints. *Aquatic Toxicology*. 165: 210-221.
- Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero C., Cid, Á. (2015). *Chlamydomonas reinhardtii* cells adjust the metabolism to maintain viability in response to atrazine stress. *Aquatic Toxicology*. 165: 64-72.
- Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A. (2016). Early alterations on photosynthesis-related parameters in *Chlamydomonas reinhardtii* cells exposed to atrazine: A multiple approach study. *Science of Total Environment*. 175: 237-245.
- Fábregas, 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: 207-215.
- Farré, M.I., Pérez, S., Kantiani, L., & Barceló, D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry*. 27: 991-1007.
- Ferreira, C.S.G., Nunes, B. Á., Henriques-Almeida, J. M., Guilhermino, L. (2007) Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 67: 452-458.
- Franklind, N.M., Stauber, J.L., Markich, S.J., Lim, R.P. (2000). pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*). *Aquatic Toxicology*. 48: 275-289.

- 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.
- Gonzalez-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltes, K., Marco, E., Fernández-Piñas, F. (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research* 47, 2050-2064.
- Halling-Sørensen, B., Sengeløv, G., Tjørnelund J. (2002) Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.*, 42: 263–271
- Holmstrup, M., Bindesbol, A. M., Oostingh, G. J., Duschl, A., Scheil, V., Kohler, H. R., Loureiro S., Soares, A., Ferreira, A. L. G., Kienle, C., Gerhardt, A., Laskowski, R., Kramarz, P. E., Bayley, M., Svendsen, C., Spurgeon, D. J. (2010). Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Science of Total Environment*. 408: 3746-3762
- Jammers, 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.
- Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. 167: 191-194.
- Korkaric, M., Behra, R., Fischer, B. B., Junghans, M., Eggen, R. I. L. (2015). Multiple stressor effects in *Chlamydomonas reinhardtii* – Toward understanding mechanisms of interaction between effects of ultraviolet radiation and chemical pollutants. *Aquatic Toxicology*. 18-28
- Lage, O.M., Sansonetty, F., O'Connor, J-E., Parente, A.M., 2001. Flow cytometric analysis of chronic and acute toxicity of copper (II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Cytometry* 44: 226-235.
- 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.
- Lützhof, H.C., Halling-Sorensen, B., Jorgensen, S.E. (1998). Algal Toxicity of Antibacterial Agents Applied in Danish Fish Farming. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 36: 1-6.
- Ma, J., Wang, S., Wang, P., Ma, L., Chen, X., Xu, R. (2016) Toxicity assessment of 40 herbicides to the Green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60: 456-462.
- Martin, J. P., Colina, K., Logsdon, N. (1987) Role of Oxygen Radicals in the Phototoxicity of Tetracyclines toward *Escherichia coli* B. *Journal of Bacteriology*. 169: 2516-2522.

- Martínez, R. S., Di Marzio, W. D., Sáenz, M. E. (2014). Genotoxic effects of commercial formulations of Chlorpyrifos and Tebuconazole on green algae. *Ecotoxicology*. 24: 45-54.
- Matamoros, V., Uggetti, E., García, J., Bayona, J. M. (2016). Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: a laboratory scale study. *Journal of hazardous materials*, 301: 197-205.
- McCormick, P.V., Cairns, J.J. (1994). Algae as indicators of environmental change. *Journal of Applied Phycology*. 6: 509-526.
- McFadden, G.I., Roos, D.S., 1999. Apicomplexan plastids as drug targets. *Trends in Microbiology*. 7(8): 328-333.
- Mitscher, L.A. (1978) *The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics*. M. Dekker, Michigan (EEUU).
- Moro, I., Matozzo, V., Piovan, A., Moschin, E., Vecchia, F. D. (2014). Morphophysiological effects of ibuprofen on *Scenedesmus rubescens*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 38: 379-387.
- Murray, K.E., Thomas, S.M., Bodour, A.A. (2010). Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environmental Pollution*, 158 (12): 3462-3471.
- 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. *Aquatic Toxicology*. 90: 223-227.
- Pérez, C. (2010) *Guía dos Microorganismos das Augas Continentais*. Bahía Edicións, A Coruña (España).
- Pietrini, F., Di Baccio, D., Aceña, J., Pérez, S., Barceló, D., Zacchini, M. (2015). Ibuprofen exposure in *Lemna gibba* L.: Evaluation of growth and phytotoxic indicators, detection of ibuprofen and identification of its metabolites in plant and in the medium. *Journal of hazardous materials*, 300: 189-193.
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Abalde, J., Cid, A., 2009a. Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat. *Environment International*. 35: 240-247.
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A. (2015). Suitability of cytotoxicity endpoints and test microalgal species to disclose the toxic effect of common aquatic pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 114: 117-125.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A. (2009). The herbicide paraquat induces alterations in the elemental and biochemical composition of non-target microalgal species. *Chemosphere*. 76: 1440-1444.

- Pratt, W. (1981). *Quimioterapia de la infección*. Ed. Oxford University Press. Oxford (Reino Unido).
- 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.
- Regel, R. H., Ferris, J. M., Ganf, G. G. y Brookes, J. D. (2002). Algal esterase activity as a bioassay of environmental degradation in a freshwater creek. *Aquatic Toxicology*. 59: 209-223.
- Rioboo, C., Prado, R., Herrero, C., Cid, Á. (2007). Population growth study of the rotifer *Brachionus sp.* fed with triazine-exposed microalgae. *Aquatic toxicology*. 83: 247-253.
- Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. (2014). Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. *Marine Environmental Research*. 101: 1-7
- 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.
- Tukaj, Z., Matusiak-mikulin, K., Lewandowska, J. y Szurkowski, J. (2003). Changes in the pigment patterns and the photosynthetic activity during a light-induced cell cycle of the green alga *Scenedesmus armatus*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41: 337-344.
- Van Wezel A. P. & van Vlaardingen P. (2004). Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquatic Toxicology*, 66: 427-444.
- Vannini, C., Domingo, G., Marsoni, M., De Mattia, F., Labra, M., Castiglioni, S., & Bracale, M. (2011). Effects of a complex mixture of therapeutic drugs on unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquatic Toxicology*. 101: 459-465.
- Vass, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuniemi, A., Aro, E., Andersson, B. (1992). Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89 (4): 1408-1412.
- Walsh, G. E., Deans, C. H. & McLaughlin, M. J., (1987). Comparisons of the EC50s of algal toxicity test calculated by four methods. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 6: 767-770
- Xu, D., Li, C., Chen, H. & Shao, B. (2013). Cellular response of freshwater green algae to perfluorooctanoic acid toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 88: 103-107.

## **Abreviaturas**

|                        |                                 |
|------------------------|---------------------------------|
| <b>AI</b>              | Alta irradiancia                |
| <b>BI</b>              | Baja irradiancia                |
| <b>DMSO</b>            | Dimetil sulfóxido               |
| <b>FDA</b>             | Diacetato de fluoresceína       |
| <b>IC<sub>50</sub></b> | Concentración inhibitoria media |
| <b>OTC</b>             | Oxitetraciclina                 |
| <b>PBS</b>             | Tampón fosfato salino           |