

# **Efecto tóxico de microcontaminantes acuáticos emergentes sobre microalgas marinas mediante el análisis de biomarcadores de citotoxicidad**

Memoria presentada para optar  
al grado de Doctor Internacional

**Marta Seoane Méndez**

---

**TESIS DOCTORAL  
2018**

Directora / Tutora: Dra. Ángeles Cid Blanco

Programa de doctorado en *Marine Science, Technology and Management*  
(DO\*MAR)



UNIVERSIDADE DA CORUÑA









UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**Efecto tóxico de microcontaminantes acuáticos emergentes  
sobre microalgas marinas mediante el análisis  
de biomarcadores de citotoxicidad**

**Efecto tóxico de microcontaminantes acuáticos emerxentes  
sobre microalgas mariñas mediante a análise  
de biomarcadores de citotoxicidade**

**Toxic effect of emerging aquatic micropollutants  
on marine microalgae through the analysis  
of cytotoxicity biomarkers**

Tesis de doctorado / Tese de doutoramento / PhD Thesis

**Marta Seoane Méndez**

Directora / Directora / Supervisor

Dra. Ángeles Cid Blanco

Tutora / Titora / Tutor

Dra. Ángeles Cid Blanco

Departamento de Bioloxía. Facultade de Ciencias.

Programa oficial de Doutoramento en *Marine Science, Technology and Management* (DO\*MAR). RD 99/2011









ÁNGELES CID BLANCO, Profesora Titular de Universidad del Área de Microbiología del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña,

INFORMA:

que la licenciada en Biología y alumna de tercer ciclo del programa oficial de doctorado en *Marine Science, Technology and Management* (DO\*MAR) Dña. **Marta Seoane Méndez**, ha realizado en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña el trabajo con el título **“Efecto tóxico de microcontaminantes acuáticos emergentes sobre microalgas marinas mediante el análisis de biomarcadores de citotoxicidad”** bajo mi dirección y que presenta para optar al Grado de Doctor Internacional. Considerándolo finalizado, autorizo su presentación y defensa.

Y para que así conste, firmo el presente en A Coruña a 4 de mayo de 2018.

Fdo.: Dra. Ángeles Cid Blanco  
Directora de la Tesis Doctoral

Fdo.: Marta Seoane Méndez  
Doctoranda







La realización de esta tesis ha sido posible gracias a un contrato predoctoral para la formación de doctores contemplado en el Plan gallego de investigación, innovación y crecimiento 2011-2015 (Plan I2C) de la Consellería de Cultura, Educación y Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia.

Durante su elaboración se ha realizado una estancia de investigación predoctoral gracias a una beca del *Campus do Mar* en el *Laboratoire des sciences de l'environnement marin* (LEMAR), *Institut Universitaire Européen de la Mer* (IUEM), *Université de Bretagne Occidentale* (UBO) bajo la supervisión del Dr. Philippe Soudant, Director de Investigación del *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS).



Este estudio, al menos en su parte final, se incluye en el proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad con referencia CTM2017-88668-R.

Por último, esta tesis doctoral ha sido mejorada por las indicaciones hechas tanto por los expertos doctores extranjeros (M. Moreira-Santos y M. Pacheco) como por los miembros de la Comisión de Seguimiento del programa de doctorado DO\*MAR (J. Serôdio y E. Fernández).









*A mis padres*



## *Agradecimientos*

Ha llegado el momento en el que por fin veo finalizada mi tesis doctoral y siento que todo el esfuerzo ha merecido la pena. Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible que hoy las esté escribiendo y que con su ayuda, también han colaborado en la realización del presente trabajo.

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. Ángeles Cid, directora de esta tesis, el haberme dado la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación. Gracias por confiar en mí, por tu inestimable ayuda, apoyo y cariño, tanto en lo profesional como en lo personal, gracias por dejarme ser “TuMarta”.

Gracias a todos los miembros del Laboratorio de Microbiología por atender siempre mis dudas con una sonrisa. A Carmen Rioboo, por su cariño y positivismo y por haberme iniciado en la citometría de flujo; a Concepción Herrero, por transmitirme su pasión por la microbiología y por su concienzuda revisión de las publicaciones; a Rosa García, por su interés y contagiosa alegría y por estar siempre dispuesta a echar una mano; a Enrique Torres, por su ayuda con el manejo de equipos y con mis problemas informáticos; a Pablo Fidalgo, por su gran ayuda con la docencia; a Julio Abalde, por su dedicación, empeño y apuesta por una universidad pública de calidad; y por último, a Raquel Prado, que aunque no tuve el placer de llegar a conocerla, su enorme lucha, trabajo y esfuerzo, nos ha dejado un legado sin el cual la realización de este trabajo hubiera sido mucho más complicada.

Por supuesto, no me olvido de mis compañeros de laboratorio, en especial de Marta Esperanza, mi compañera de poyata (y de habitación en los congresos), por haberme acompañado desde el principio en esta aventura. Para mí también ha sido un placer compartir estos años contigo. Y de Sergio Santaefemia y Roi Mera, por su bondad y su inmenso trabajo y esfuerzo. A los tres os deseo lo mejor, mucho ánimo y suerte en vuestro futuro como investigadores.

También quiero dar las gracias a todas las personas del *Laboratoire des Sciences de l'Environnement MARin* (LEMAR), en especial al Dr. Philippe Soudant, por acogerme en su equipo de investigación y darme la oportunidad de vivir esa experiencia; y a Carmen González e Ika Paul-Pont por toda su ayuda durante mi estancia en Brest.

Gracias a toda mi familia y amigos. En especial a mis padres, a los que dedico esta tesis, como no podía ser de otra forma. Gracias por haberme dado la oportunidad de cumplir todos mis sueños y por apoyarme y animarme siempre. A mis hermanos Almu y Manu, por todo lo que me quieren. Es difícil expresar con palabras la admiración que siento por ellos. A Armando, que para mí ya es mi otro hermano mayor; y a Alba, a la que le auguro un futuro prometedor como investigadora. A mi abuelo, por la ilusión que le hizo siempre tener una nieta bióloga e investigadora. A mi abuela, que aunque lamentablemente no pudo ver concluido este trabajo, sé que estaría muy orgullosa de mí. Y a Dana, que se ha llevado un trocito de mi corazón. Todavía no he llegado a entender cómo puede haber tanto amor en algo tan pequeño.

Por último, gracias también a mi familia política, Encarna, Pepe, Susana, José, Andrea y Alba, por todo vuestro cariño durante estos años. Y a Pablo, gracias por compartir tu vida conmigo, por enseñarme que con trabajo y esfuerzo se puede conseguir todo lo que te propongas, por apoyarme, entenderme y cuidarme y sobre todo, por esas escapadas de desconexión: la naturaleza, tú y yo, no hace falta nada más.





*"... Eu non sei se esvarío. Vexo o mundo darredor de min e adoezo por entendelo. Vexo sombras e luces, nubeiros que viaxan, lume, árbores. ¿Que é todo isto? Ninguén me di, poño por caso, para que sirven as estrelas, nin onde morren os paxaros...*

*... Pero para min é milagre todo. Dende as pingueiras da chuvia ata o canto do grilo...*

*...¡Se poidese entender moitas cousas! Ou falar tan siquera delas; contarlle ós demais as miñas cavilacións. Pero xa o teño feito e rínseme. E a min doime. Doime que a xente ande polo mundo como andan as vacas e os burros: procurando soamente o pesebre...*

*... Xurei para min que cando chegue a grande farei cousas de valemto para non morrer de todo cando morra"*

*Balbino.*

Memorias dun neno labrego (1961). Xosé Neira Vilas (1928 – 2015)

*"Esto fue para mí, de entre las maravillas que he descubierto en la naturaleza, la más maravillosa de todas; y debo decir por mi parte que mi ojo no ha alcanzado un placer mayor que estos espectáculos de tantos miles de criaturas vivientes en una pequeña gota de agua moviéndose cada una de ellas con su movimiento particular. Y si dijera que había cien mil en una gota... no me equivocaría"*

A. van Leeuwenhoek (1632 – 1723)









## **ÍNDICE**

---



## Índice general

Índice general.....	I
Índice de figuras .....	V
Índice de tablas .....	VII
Lista de abreviaturas .....	IX
Resumen .....	XI
Resumo .....	XII
Abstract .....	XIII

---

<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1. Contaminación marina.....	3
1.2. Contaminantes emergentes.....	5
1.2.1. Fármacos .....	6
1.2.1.1. Antibióticos .....	8
1.2.1.2. Antiinflamatorios no esteroideos .....	9
1.2.1.3. Inhibidores de la bomba de protones.....	10
1.2.2. Productos de cuidado e higiene personal .....	10
1.2.2.1. Filtros solares.....	11
1.2.2.2. Conservantes .....	12
1.2.2.3. Fragancias .....	13
1.3. Microalgas: importancia ecológica y uso en estudios de ecotoxicidad.....	15
1.3.1. Parámetros estudiados en los bioensayos con microalgas.....	22
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>27</b>
<b>3. Material y métodos .....</b>	<b>31</b>

---

3.1. Descripción de <i>Tetraselmis suecica</i> (Kylin) Butcher .....	33
3.2. Cultivo de <i>Tetraselmis suecica</i> .....	35
3.3. Contaminantes emergentes.....	37
3.3.1. Fármacos .....	37
3.3.1.1. Antibióticos .....	37
3.3.1.2. Omeprazol .....	39
3.3.2. Productos de cuidado e higiene personal .....	40
3.3.2.1. Benzofenona-3 .....	40
3.3.2.2. Triclosán .....	41
3.3.2.3. Tonalide.....	42
3.4. Diseño experimental .....	43
3.5. Análisis por citometría de flujo (CMF).....	44
3.5.1. Determinación de la densidad celular .....	48
3.5.2. Propiedades inherentes celulares.....	48
3.5.3. Viabilidad celular.....	49
3.5.4. Actividad metabólica .....	51
3.5.5. Estrés oxidativo .....	52
3.5.6. Potencial de membrana citoplasmática .....	55
3.5.7. Potencial de membrana mitocondrial .....	58
3.5.8. pH intracelular .....	59
3.6. Determinación espectrofotométrica de clorofila <i>a</i> .....	62
3.7. Análisis estadístico .....	62
<b>4. Resultados.....</b>	<b>63</b>
4.1. Capítulo I: Toxicidad ejercida por tres antibióticos utilizados en acuicultura en la microalga marina <i>Tetraselmis suecica</i> (Kylin) Butch.....	65
4.2. Capítulo II: Citotoxicidad del omeprazol, un fármaco inhibidor de la bomba de protones, en la microalga marina <i>Tetraselmis suecica</i> .....	77

---

4.3. Capítulo III: Panel citómico para evaluar los efectos a corto plazo de la exposición a distintos productos de cuidado e higiene personal en la microalga marina <i>Tetraselmis suecica</i> .....	93
<b>5. Discusión .....</b>	<b>107</b>
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>139</b>
<b>7. Conclusions .....</b>	<b>145</b>
<b>8. Bibliografía .....</b>	<b>151</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>187</b>
Anexo I. Publicaciones .....	189
Anexo II. Comunicaciones a congresos .....	191





## Índice de figuras

**Figura 1.** *Tetraselmis suecica*. Imagen de microscopía óptica de *T. suecica* **(A)**. Sección transversal de la parte apical de la célula donde se encuentra la invaginación de la que salen los flagelos **(B)**. Sección transversal de un flagelo mostrando la estructura 9+2 del axonema **(C)**. Sección longitudinal de un flagelo con mastigonemas **(D)**. Aparato de Golgi produciendo partículas escamosas enviadas a la superficie celular donde se ensamblan para formar la teca **(E)**. Sección longitudinal de la célula mostrando la ultraestructura celular **(F)**. Fases terminales de la división celular (fisión binaria longitudinal) **(G)**. Esquema del ciclo celular de *T. suecica* (Abiusi et al., 2014) **(H)**.

Se muestra: AP: hendidura apical; BB: cuerpo basal; CF: surco de escisión; CHL: cloroplasto; CHLL: lóbulo del cloroplasto; CPY: canal citoplasmático en el pirenoide; FL: flagelo; G: aparato de Golgi; GV: vesículas de Golgi; M: mitocondria; N: núcleo; NE: envoltura nuclear; NS: nucléolo; PM: membrana plasmática; PY: pirenoide; SC: ensamblaje de partículas escamosas para formar la teca; STA: gránulo de almidón; ST: estigma; TH: teca; THD: teca de célula hija; THM: teca de célula madre; THYL: tilacoides (van den Hoek et al., 1995).....**34**

**Figura 2.** Esquema de los componentes de un citómetro de flujo. (Imagen modificada de Rahman, 2014).....**45**

**Figura 3.** Validación del método de análisis de viabilidad de células de *T. suecica* mediante CMF utilizando IP. Los citogramas muestran los porcentajes de células viables (IP-) y no viables (IP+) correspondientes a mezclas de células vivas/muertas: 100/0 % **(A)**; 50/50 % **(B)** y 0/100 % **(C)**.....**50**

**Figura 4.** Validación del método de análisis de actividad celular en *T. suecica* mediante CMF utilizando FDA. Los citogramas muestran los porcentajes de células activas (FDA+) y no activas (FDA-) correspondientes a mezclas de células vivas/muertas: 100/0 % **(A)**; 50/50 % **(B)** y 0/100 % **(C)**.....**52**

- 
- Figura 5.** Validación del método de determinación de ión superóxido intracelular en *T. suecica* mediante CMF utilizando HE. Se representan los citogramas correspondientes a un cultivo control **(A)** y un cultivo expuesto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM **(B)**.....54
- Figura 6.** Validación del método de determinación de peróxido de hidrógeno intracelular en *T. suecica* mediante CMF utilizando DHR 123. Se representan los citogramas biparamétricos correspondientes a un cultivo control **(A)**, a un cultivo expuesto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5mM **(B)** y los citogramas de la fluorescencia del DHR 123 de ambos cultivos superpuestos **(C)**.....55
- Figura 7.** Validación del método de determinación del potencial de membrana citoplasmático en *T. suecica* mediante CMF utilizando DiBAC<sub>4</sub>(3). Se representan los citogramas correspondientes a un cultivo control sin digitonina **(A)** y a un cultivo incubado con digitonina **(B)** .....57
- Figura 8.** Validación del método de determinación del potencial de membrana mitocondrial en *T. suecica* mediante CMF utilizando JC-1. En los citogramas biparamétricos se representa la fluorescencia emitida por la forma monomérica del fluorocromo (FL1) frente a la fluorescencia emitida por la forma agregada del mismo (FL3), para células control **(A)** y células incubadas con CCCP **(B)**.....59
- Figura 9.** Validación del método de análisis del pH<sub>i</sub> en *T. suecica* mediante CMF utilizando BCECF AM. En los citogramas biparamétricos se representa la fluorescencia del fluorocromo recogida en los detectores FL1 y FL3 para un cultivo en solución tampón fosfato pH 6 **(A)** y un cultivo en solución tampón fosfato pH 8 **(B)**.....61

---

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Composición del medio de cultivo Algal-1 (Herrero et al., 1991). Concentración de cada compuesto ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en el medio de cultivo final .....	<b>36</b>
<b>Tabla 2.</b> Contaminantes emergentes objeto de estudio.....	<b>43</b>
<b>Tabla 3.</b> Valores de $\text{EC}_{50}$ para el crecimiento obtenidos tras 96 h de exposición a los contaminantes emergentes ensayados, pertenecientes a los distintos grupos: antibióticos, inhibidores de la bomba de protones (PPI), filtros ultravioleta, conservantes y fragancias. Los resultados se expresan en concentración de contaminante por volumen de medio de cultivo ( $\text{mg L}^{-1}$ ) y en concentración de contaminante por célula o cuota celular ( $\text{ng célula}^{-1}$ ).....	<b>113</b>
<b>Tabla 4.</b> Respuesta citotóxica de <i>T. suecica</i> tras 24 h de exposición a los distintos contaminantes emergentes atendiendo a los biomarcadores de citotoxicidad más sensibles utilizados en este estudio. En el potencial de membrana medido con el fluorocromo DiBAC <sub>4</sub> (3), un incremento se corresponde con una despolarización de la membrana; mientras que un descenso se corresponde con una hiperpolarización. s/c = sin cambios significativos a las concentraciones ensayadas ( $p \geq 0,05$ ).....	<b>136</b>



---

## Lista de abreviaturas

**ADN.** Ácido desoxirribonucleico.

**AEMA.** Agencia Europea de Medio Ambiente.

**AHTN.** Tonalide.

**AINE.** Antiinflamatorio no esteroideo.

**ANOVA.** Analysis of variance (Análisis de la varianza).

**BCECF AM.** 2',7'-bis(2-carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceína acetometil éster.

**BP-3.** Benzophenone-3 (Benzofenona-3).

**CCCP.** Carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone (Carbonilcianida m-clorofenilhidrazona).

**CE.** Comisión Europea.

**CEE.** Comunidad Económica Europea.

**CLO.** Cloranfenicol.

**CMF.** Citometría de flujo.

**DHR 123.** Dihidrorrodamina 123.

**DiBAC<sub>4</sub>(3).** Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol. (Bis-(1,3-ácido dibutilbarbiturico) trimetino oxonol).

**DMSO.** Dimetilsulfóxido.

**EC<sub>50</sub>.** Median Effective Concentration (Concentración efectiva media).

**EDAR.** Estación depuradora de aguas residuales.

**FDA.** Fluorescein Diacetate (Diacetato de fluoresceína).

**FL.** Fluorescencia.

**FL LIN.** Fluorescencia lineal.

**FL LOG.** Fluorescencia logarítmica.

**FLO.** Florfenicol.

**FS.** Forward scatter light (Luz refractada hacia delante).

**HE.** Hidroetidina.

**IP.** Ioduro de propidio.

**ISO.** International Organization for Standardization (Organización Internacional de Normalización).

**JC-1.** Ioduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbo Cianina.

**OECD.** Organisation for Economic Co-operation and Development (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos).

**OMP.** Omeprazol.

**OMS.** Organización Mundial de la Salud.

**OTC.** Oxitetraciclina.

**PBS.** Phosphate buffered saline (Tampón fosfato salino).

**PCPs.** Personal care products (Productos de cuidado e higiene personal).

**PM.** Peso molecular.

**PPI.** Proton pump inhibitor (Inhibidor de la bomba de protones).

**PSII.** Photosystem II (Fotosistema II).

**REACH.** Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y preparados químicos).

**ROS.** Reactive oxygen species (Especies reactivas de oxígeno).

**SCCS.** Scientific Committee on Consumer Safety (Comité Científico de Seguridad del Consumidor).

**SS.** Side scatter light (Luz refractada lateralmente).

**TCS.** Triclosán.

**u.a.** Unidades arbitrarias.

**UE.** Unión Europea.

**US EPA.** United States Environmental Protection Agency (Agencia para la Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos).

**US FDA.** United States Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos).

**UV.** Ultravioleta.

## Resumen

Debido a la creciente presencia de microcontaminantes emergentes en el medio marino, ha surgido la necesidad de estudiar la potencial toxicidad de estos compuestos sobre organismos acuáticos como las microalgas, utilizadas como indicadores de la contaminación debido a su papel fundamental como productores primarios. En este trabajo se propone una aproximación metodológica basada en el análisis citómico, para caracterizar las alteraciones producidas por distintos compuestos pertenecientes a las principales clases de fármacos y productos de cuidado e higiene personal, en la microalga marina *Tetraselmis suecica*, y establecer marcadores específicos de contaminación que sean sensibles y de respuesta rápida. Esta microalga verde es de crecimiento rápido, fácil de cultivar en laboratorio y muy utilizada en acuicultura como cultivo auxiliar. Todos los contaminantes emergentes ensayados, los antibióticos cloranfenicol, florfenicol y oxitetraciclina, el fármaco omeprazol, el filtro solar benzofenona-3, el conservante triclosán y la fragancia tonalide, provocaron alteraciones fisiológicas en *T. suecica*. La autofluorescencia celular, la actividad esterasa y el potencial de membrana citoplasmático, han sido los parámetros más sensibles, mostrando alteraciones significativas en las células transcurridas sólo 24 h de exposición a los contaminantes, antes de poder detectar cambios en el crecimiento o viabilidad celular de los cultivos.

## Resumo

Debido á crecente presenza de microcontaminantes emerxentes no medio mariño, xurdiu a necesidade de estudar a potencial toxicidade destes compostos sobre organismos acuáticos como as microalgas, utilizadas como indicadores da contaminación debido ao seu papel fundamental como produtores primarios. Neste traballo propónse unha aproximación metodolóxica baseada na análise citómica, para caracterizar as alteracións producidas por distintos compostos pertencentes ás principais clases de fármacos e produtos de coidado e hixiene persoal, na microalga mariña *Tetraselmis suecica*, e establecer marcadores específicos de contaminación que sexan sensibles e de resposta rápida. Esta microalga verde é de crecemento rápido, fácil de cultivar en laboratorio e moi utilizada en acuicultura como cultivo auxiliar. Todos os contaminantes emerxentes ensaiados, os antibióticos cloranfenicol, florfenicol e oxitetraciclina, o fármaco omeprazol, o filtro solar benzofenona-3, o conservante triclosán e a fragancia tonalide, provocaron alteracións fisiolóxicas en *T. suecica*. A autofluorescencia celular, a actividade esterasa e o potencial de membrana citoplasmático, foron os parámetros máis sensibles, mostrando alteracións significativas nas células transcorridas só 24 h de exposición aos contaminantes, antes de poder detectar cambios no crecemento ou viabilidade celular dos cultivos.



### **Abstract**

Due to the growing presence of emerging micropollutants in the marine environment, the need to study the potential toxicity of these compounds on aquatic organisms such as microalgae has arisen. These microorganisms are used as indicators of pollution due to their fundamental role as primary producers. This study suggests a methodological approach based on the cytometric analysis, to characterize the alterations produced by different compounds belonging to the main classes of pharmaceuticals and personal care products, on the marine microalga *Tetraselmis suecica*, and to establish sensitive and fast specific markers of pollution. This green microalga is fast-growing, easy to culture in the laboratory and widely used in aquaculture as auxiliary culture. All the assayed emerging pollutants, the antibiotics chloramphenicol, florphenicol and oxytetracycline, the pharmaceutical omeprazole, the ultraviolet filter benzophenone-3, the disinfectant triclosan and the fragrance tonalide, caused physiological alterations in *T. suecica*. Cell autofluorescence, esterase activity and cytoplasmic membrane potential were the most sensitive parameters, showing significant alterations in the cells after only 24 h of exposure to the pollutants, before being able to detect changes in cell growth or viability of the cultures.







# **1. INTRODUCCIÓN**

---



## 1.1. Contaminación marina

El agua es un recurso natural indispensable para la vida y el sostenimiento del medio ambiente que, como consecuencia del rápido desarrollo humano y del uso inadecuado que se ha hecho de ella, ha sufrido un alarmante deterioro. Los sistemas acuáticos ejercen funciones importantes para el correcto funcionamiento del planeta debido a que sirven de sustento de flora y fauna y poseen un papel fundamental en el mantenimiento de los ciclos naturales de nutrientes (ciclo del carbono, nitrógeno, fósforo, etc.). Pero estos sistemas no sólo son importantes por la gran cantidad de organismos que los habitan, sino porque muchos organismos terrestres, entre ellos el hombre, dependen de este importante recurso para su supervivencia. La preservación de los ecosistemas acuáticos es, por tanto, necesaria para la conservación de la vida y la diversidad.

Entre los ecosistemas acuáticos podemos diferenciar ecosistemas marinos y dulceacuícolas. Los océanos y mares cubren aproximadamente tres cuartas partes de la superficie terrestre, contienen cerca del 97 % del agua del planeta y se ha estimado que alrededor del 80 % de la vida en la Tierra depende de la salud de estos ecosistemas (Barange et al., 2010). Los océanos han sufrido a manos del hombre durante años, pero la degradación de los ecosistemas marinos se ha acelerado notablemente en los últimos dos siglos a medida que han aumentado los vertidos industriales y la escorrentía procedente de explotaciones agrarias y de las ciudades. Durante décadas, toneladas de sustancias biológicamente activas, sintetizadas para su uso en la industria, medicina, agricultura, ganadería, acuicultura y uso doméstico, entre otros, han sido vertidas al medio ambiente sin reparar en las posibles consecuencias. Todos estos compuestos químicos pueden ejercer un efecto tóxico sobre los diversos organismos que habitan los ecosistemas acuáticos, afectando diferentes procesos fisiológicos y alterando la estructura de las comunidades biológicas (Campanella et al., 2001).

Las aguas costeras son especialmente vulnerables a la contaminación ya que reciben los impactos consecuencia del desarrollo de actividades que se realizan tanto

tierra adentro como en el mar. Además, el litoral costero suele ser el área de mayor desarrollo social, económico e industrial de la mayoría de los países. En comparación con el mar abierto, los niveles de contaminación de las aguas costeras son sustancialmente superiores, ya que el efecto de dilución y autorregeneración es mucho menor, especialmente cuando el agua se encuentra estancada o semi-encerrada como en el caso de los puertos y bahías (Gimeno et al., 2004). La contaminación de dichas aguas representa una amenaza para el medio ambiente marino, con efectos tales como toxicidad en organismos acuáticos, acumulación de contaminantes en el ecosistema y pérdida de hábitats y biodiversidad (Sánchez-Avila et al., 2012). Por otro lado, además de suponer una amenaza para la salud humana, la contaminación del medio marino puede representar un obstáculo para la explotación de sus recursos.

Una de las fuentes más importantes de contaminación de las aguas costeras es la descarga directa de aguas residuales urbanas e industriales hacia los mares. Las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), con los tratamientos convencionales, no logran eliminar por completo el complejo cóctel de contaminantes contenido en los influentes (Verlicchi et al., 2012). Los ríos son considerados también una fuente potencial de contaminantes de las aguas costeras. Al cruzar por las grandes ciudades y zonas agrícolas pueden arrastrar en su cauce parte de la contaminación generada en las cercanías de su cuenca. Por otro lado, el incremento de estaciones de acuicultura también representa un impacto directo. En estas instalaciones se utiliza una gran variedad de fármacos para prevenir infecciones y para la desinfección y terapia de especies cultivables, sustancias para prevenir el crecimiento no deseado de algas (sustancias *antifouling*) o anestésicos. La presencia de todos estos compuestos fuera de las instalaciones puede poner en riesgo otras especies no diana de los ecosistemas marinos.

Una vez que los contaminantes han alcanzado el medio marino, su comportamiento, destino y efectos dependerán de sus propiedades fisicoquímicas así como de factores propios del medio. De este modo, los compuestos más polares



pueden estar disueltos y transportarse por el agua de mar moviéndose gracias a las mareas y corrientes, mientras que los compuestos más lipofílicos tienen mayor facilidad para penetrar en los tejidos biológicos o para unirse a la materia particulada, pudiendo sedimentar en el fondo. Por ello, los organismos pueden estar expuestos a la presencia de los contaminantes ya sea en la microcapa de la superficie, la columna de agua o los sedimentos marinos. Una vez en los organismos marinos, éstos pueden ser metabolizados y/o excretados, pudiendo bioacumularse y en algunos casos biomagnificarse a través de la cadena trófica (Mackay y Fraser 2000; Rioboo et al., 2007). Durante la incorporación y transporte de los contaminantes en el medio marino pueden sucederse fenómenos de transformación o degradación, pero los compuestos resultantes pueden ser incluso más persistentes o tóxicos que el compuesto inicial (DellaGreca et al., 2003; Isidori et al., 2005; Diniz et al., 2015). Otros contaminantes tienen la capacidad de permanecer estables en el medio ambiente y de resistir a los procesos de degradación (fotolítica, química o biológica), llegando a tener una vida media de muchos años.

### 1.2. Contaminantes emergentes

Durante décadas, la comunidad científica ha centrado sus esfuerzos en el estudio de lo que se denominan contaminantes prioritarios, es decir, sustancias químicas tóxicas, persistentes y bioacumulables cuya presencia en el medio ambiente ha estado o está regulada en las distintas legislaciones (herbicidas, metales pesados, aditivos industriales, etc.). Sin embargo, en los últimos años, el desarrollo de nuevas y más sensibles técnicas analíticas, ha permitido constatar y alertar de la presencia de otros contaminantes potencialmente peligrosos denominados globalmente como emergentes (Petrović et al., 2003). Según la Directiva 2013/39/UE, en la que se establecen las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, los contaminantes emergentes se definen como contaminantes que en la actualidad no están incluidos en los programas de seguimiento sistemático en la Unión Europea (UE), pero que suponen un importante riesgo, lo cual exige su regulación, dependiendo de

sus posibles efectos ecotoxicológicos y toxicológicos, y de sus niveles en el medio acuático.

Los contaminantes emergentes son contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como tales cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, pero sí su detección y la preocupación por las posibles consecuencias de la misma. Son compuestos de distinto origen y naturaleza química de los cuales se desconoce su presencia e impacto en los distintos compartimentos ambientales ya que la disponibilidad de métodos para su análisis es todavía limitada. Por esta razón aún no han sido regulados, pero son candidatos a regulación futura dependiendo de las investigaciones sobre su incidencia, riesgo para la salud y datos ecotoxicológicos (Barceló, 2003). El estudio de estas sustancias se encuentra entre las líneas de investigación prioritarias de los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental, como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia Europea para el Medio Ambiente (AEMA) y la Agencia para la Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (US EPA).

La lista de contaminantes emergentes incluye una amplia variedad de productos de uso diario con aplicaciones tanto industriales como domésticas. Algunos de los más relevantes son: fármacos (antiinflamatorios, analgésicos, antibióticos, psicofármacos, inhibidores de la bomba de protones, reguladores de lípidos, hormonas), productos de cuidado e higiene personal (filtros solares, conservantes, desinfectantes, fragancias), microplásticos, retardantes de llama, aditivos industriales, nanopartículas, drogas de abuso, etc. Estos contaminantes se encuentran, en general, a bajas concentraciones (en el rango de  $\text{ng L}^{-1}$  y  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), pero debido al incremento de su demanda y consumo, unido a la incapacidad de las plantas depuradoras para su completa eliminación, son introducidos continuamente en el medio ambiente y no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos negativos (Petrović et al., 2003).

### **1.2.1. Fármacos**

Los fármacos son sustancias biológicamente activas utilizadas en el diagnóstico médico, tratamiento y prevención de enfermedades. Estos compuestos mejoran

nuestra calidad de vida, pero su elevada producción y utilización tanto en medicina humana como en veterinaria y el creciente número de sustancias activas disponibles, está aumentando su entrada en el medio ambiente, por lo que cada vez es mayor el impacto causado por estos compuestos o por sus metabolitos y productos de transformación en los ecosistemas naturales (Ortiz de García et al., 2013). Estos compuestos están diseñados para actuar en rutas metabólicas y moleculares específicas en humanos o animales, pero cuando se introducen en el ambiente pueden afectar las mismas vías en otros organismos con órganos, tejidos, células o biomoléculas iguales o similares.

De todos los contaminantes emergentes, los fármacos son los que han suscitado mayor preocupación y estudio en los últimos años y se han encontrado residuos de estos compuestos incluso en agua potable (Rodil et al., 2012). En la UE se utilizan alrededor de 3000 sustancias diferentes en medicina humana pertenecientes a diversos grupos como analgésicos, antiinflamatorios, antibióticos, reguladores de lípidos, inhibidores de la bomba de protones, antidepresivos, ansiolíticos, betabloqueantes, vasoconstrictores, anestésicos, anticoagulantes, inmunosupresores, hormonas, etc. (Fent et al., 2006). El consumo de estos compuestos en los países de la UE se cifra en toneladas por año y muchos de ellos, como los antibióticos, se emplean en cantidades similares a las de los pesticidas (Jones et al., 2001). Aunque la persistencia de los fármacos en general no es muy alta, son considerados contaminantes “pseudopersistentes” porque su continua liberación y entrada al medio ambiente hace que sus niveles se mantengan más o menos constantes (Hernando et al., 2006).

Los fármacos llegan al medio ambiente como consecuencia de su fabricación, del vertido incontrolado de medicamentos caducados y de su consumo, ya que tras su uso son excretados o eliminados del organismo inalterados o modificados como metabolitos a través de distintas vías (Diniz et al., 2015). Las aguas residuales municipales, hospitalarias o de las fábricas son la ruta principal de entrada de estos compuestos al medio ambiente. Además, se ha detectado que los fármacos están

presentes de forma ubicua en los efluentes de las EDAR en todo el mundo porque estas instalaciones no pueden eliminar completamente estos compuestos y sus subproductos o metabolitos (Heberer, 2002; Kolpin et al., 2002; Rosal et al., 2010). En los últimos años, la acuicultura y la ganadería se han convertido también en una fuente importante de fármacos en los ecosistemas acuáticos, ya que se utilizan diversos compuestos para el tratamiento de enfermedades o como estimulantes del crecimiento para aumentar la producción.

#### **1.2.1.1. Antibióticos**

Los antibióticos son compuestos orgánicos de bajo peso molecular (menos de 1000 Da) sintetizados por microorganismos, tanto procariotas como eucariotas, y que a bajas concentraciones inhiben el desarrollo (microbiostáticos) o matan (microbicidas) a otros microorganismos, por lo que son utilizados en medicina humana y veterinaria como agentes quimioterapéuticos antimicrobianos. Dentro de sus características destacan que son solubles en agua, efectivos a bajas concentraciones, poseen elevada estabilidad química y pueden ser de acción específica o de amplio espectro. Los primeros antibióticos fueron de origen natural, como la penicilina producida por hongos del género *Penicillium* o la estreptomycinina producida por bacterias del género *Streptomyces*. Actualmente, los antibióticos también se obtienen por síntesis química, como las sulfonamidas, o por modificación química de compuestos de origen natural y se pueden clasificar atendiendo a su estructura química o a su mecanismo de acción (Kümmerer, 2009).

Al igual que el resto de fármacos, los antibióticos llegan al medio ambiente consecuencia de su fabricación, consumo y excreción. Además, la inmensa mayoría de los fármacos utilizados en acuicultura y ganadería son antibióticos, por lo que estas actividades se han convertido en una fuente importante de estos compuestos en los ecosistemas acuáticos. Gran parte de la preocupación que genera el uso de antibióticos se centra en la aparición de resistencias bacterianas. La liberación de forma continuada de efluentes contaminados con antibióticos genera una constante presión de selección que ha propiciado el cambio en la microbiota del entorno,

incrementando la aparición de cepas resistentes (Boon y Cattanach, 1999). Los antibióticos pueden persistir en el sedimento y en los ambientes acuáticos durante varios meses después de su administración, pudiendo afectar a las comunidades bacterianas sedimentarias (Smith et al., 1994; Schmidt et al., 2001). Estudios sobre la estabilidad de algunos compuestos en los sedimentos marinos demuestran que algunos tipos de antibióticos como el ácido oxolínico, la flumequina o la oxitetraciclina, son tan estables que su vida media en las capas más profundas del sedimento marino no pudo ser determinada (Burka et al., 1997). Además, en la mayoría de los casos, los niveles tóxicos de los antibióticos se incrementan cuando se combinan entre sí, propiciando un efecto sinérgico (Rodea-Palomares et al., 2015). Estas mezclas pueden tener una acción tóxica incluso a las bajas concentraciones en las que aparecen en el medio acuático (González-Pleiter et al., 2013).

### **1.2.1.2. Antiinflamatorios no esteroideos**

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son un grupo de fármacos con efectos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios, en el que se incluyen, por ejemplo, el ibuprofeno, diclofenac, ketoprofeno, naproxeno o el ácido acetilsalicílico. Actúan bloqueando las enzimas que ayudan a la producción de prostaglandinas, un grupo de compuestos lipídicos derivados de ácidos grasos que se producen naturalmente y que tienen un papel importante en el dolor y la inflamación. Por lo tanto, se utilizan en todo el mundo para el alivio del dolor en adultos y para reducir los signos de inflamación como fiebre o hinchazón. Se consumen tanto para problemas de salud temporales, como para problemas crónicos a largo plazo, o incluso como método preventivo como es el caso del uso del ácido acetilsalicílico para reducir la posibilidad de sufrir un ataque cardíaco o accidente cerebrovascular en personas de alto riesgo. Por todo ello y debido, en parte, a que muchos de ellos no requieren prescripción médica, son el grupo de medicamentos de uso más frecuente y detectados comúnmente en las aguas europeas (Buchberger, 2007; Behera et al., 2012; Martínez-Bueno et al., 2012).

### 1.2.1.3. Inhibidores de la bomba de protones

Los inhibidores de la bomba de protones o PPI (por sus siglas en inglés; *proton pump inhibitors*) son un grupo de fármacos diseñados como bases débiles que pueden reaccionar con el ácido secretado en las células parietales de la mucosa gástrica, dando como resultado una forma tiofílica del fármaco que puede unirse a los residuos de cisteína de la bomba de protones ( $H^+/K^+$ -ATPasa) (Sachs et al., 1995; Vesper et al., 2009). De este modo, actúan bloqueando irreversiblemente la enzima  $H^+/K^+$ -ATPasa de las células parietales, disminuyendo la cantidad de ácido secretado al estómago al actuar en el último eslabón fisiológico del proceso (Horn, 2000; Sterbini et al., 2016). Este grupo de fármacos se utiliza para el tratamiento de trastornos gastrointestinales como dispepsia, reflujo gastroesofágico, úlcera péptica e infección por *Helicobacter pylori* (Kosma et al., 2016). Aunque la vida media en plasma es corta (de 1 a 2 horas) su efecto es más prolongado debido a que la inhibición irreversible requiere la síntesis de nuevas bombas de protones para reanudar la secreción ácida.

La familia de los PPI constituye uno de los grupos de fármacos de mayor consumo en todo el mundo. Actualmente se comercializan distintos fármacos dentro de este grupo como omeprazol, esomeprazol, lansoprazol, rabeprazol, o pantoprazol, todos ellos moléculas bencimidazólicas en su estructura, que pueden diferir a nivel celular en la velocidad con la que éstos se ligan y disocian de la  $H^+/K^+$ -ATPasa, así como en los distintos residuos cisteínicos a los que se unen.

### 1.2.2. Productos de cuidado e higiene personal

Los productos de cuidado e higiene personal o PCPs (por sus siglas en inglés; *personal care products*) son un grupo diverso de compuestos usados en jabones, lociones, pastas de dientes, perfumes, protectores solares, etc. Los PCPs son productos destinados a uso externo, por lo que no están sujetos a alteraciones metabólicas y pueden entrar inalterados en el medio ambiente. Las principales clases de PCPs incluyen filtros solares, conservantes o desinfectantes y fragancias (Brausch et al., 2011). Todos estos compuestos se utilizan en grandes cantidades y ya han sido detectados con frecuencia en las aguas superficiales de todo el mundo (Peck, 2006;

Montes-Grajales et al., 2017), sin embargo, se sabe relativamente poco acerca de su ecotoxicidad.

#### **1.2.2.1. Filtros solares**

La progresiva destrucción de la capa de ozono, la cual absorbe gran parte de la radiación ultravioleta (UV), unida a los largos periodos de exposición solar, principalmente en actividades de ocio, ha contribuido a una mayor incidencia de las enfermedades relacionadas con la piel. Dada la concienciación actual que existe con respecto a estos efectos perjudiciales de la radiación solar, los filtros que actúan de pantalla frente a los rayos UV se utilizan cada vez con más frecuencia y en mayor cantidad en la industria cosmética. Además, existen filtros solares que se utilizan también en otras actividades industriales como conservantes, potenciadores del sabor y el olor, fotoionizadores o inhibidores de polimerización (conservación de pinturas, plásticos, textiles, etc) (Giokas et al., 2007).

Durante años, la única preocupación con respecto a estos compuestos hacía referencia a su eficacia para atenuar los efectos nocivos de la radiación UV sin causar riesgo a la salud humana. No ha sido hasta las últimas dos décadas que se dispone de los primeros datos, aunque escasos, sobre su presencia, destino y efectos en el medio ambiente (Poiger et al., 2004). Los filtros solares acceden al medio acuático por vía directa, a través de actividades acuáticas recreativas y por vía indirecta, a través de las estaciones de tratamiento de aguas residuales (Balmer et al., 2005). El uso de estos compuestos es especialmente alto en las costas españolas, donde se llevan a cabo gran cantidad de actividades acuáticas recreativas, sobre todo en temporada estival, por lo que una gran cantidad de estos compuestos van a parar al medio marino.

Hasta el momento, los estudios sobre la presencia de filtros UV en el medio ambiente son muy limitados (Díaz-Cruz et al., 2012; Rodil et al., 2012; Benedé et al., 2014), especialmente si los comparamos con los referidos a otros contaminantes emergentes como los fármacos. Los escasos estudios que existen sobre la degradación de estos compuestos en EDARs indican que la eliminación es incompleta para los pocos compuestos investigados, lo que pone en evidencia la necesidad de desarrollar nuevos

procesos de tratamiento de aguas para su completa eliminación (Gago-Ferrero et al., 2011).

Los filtros UV se pueden dividir en dos grandes grupos teniendo en cuenta su naturaleza:

- Filtros inorgánicos o físicos, son aquellos que poseen una función fundamentalmente impermeabilizante, reflejando gran parte de la radiación UV que les llega. Debido a la uniformidad de las partículas que los componen y su tamaño son fotoestables y seguros. Se utilizan como tales algunos óxidos metálicos, los más representativos son el óxido de zinc y el dióxido de titanio.

- Filtros orgánicos o químicos, son aquellos que absorben la radiación UV. Se trata de moléculas orgánicas constituidas por uno o varios anillos bencénicos, conjugados con dobles enlaces C-C y/o grupos carbonilo, proporcionando un sistema de alta deslocalización electrónica, que les confiere un elevado coeficiente de absortividad molar en la zona UVA (400-320 nm) y/o UVB (320-290 nm).

Existen 28 filtros UV regulados en la UE para su uso en la industria cosmética (Anexo VI Reglamento (CE) Nº 1223/2009) de los cuales 27 son orgánicos y 1, el dióxido de titanio, inorgánico. La legislación estipula el porcentaje, en peso de producto acabado, de cada compuesto permitido en las formulaciones cosméticas.

#### **1.2.2.2. Conservantes**

Los conservantes son sustancias cuya principal función es inhibir el desarrollo de microorganismos en los productos durante la fabricación, almacenaje y uso cotidiano del consumidor, aunque también se emplean como antioxidantes para evitar la degradación por exposición al oxígeno. Estas sustancias se utilizan en la elaboración de numerosos PCPs como jabones, pasta de dientes o cosméticos e incluso en fármacos o alimentos (Daughton y Ternes, 1999).

La presencia de conservantes en los distintos productos de consumo es necesaria para evitar riesgos al consumidor derivados del crecimiento microbiano. Sin embargo, su presencia puede provocar daños no solo medioambientales, sino también para la salud de los consumidores. A diferencia de los antibióticos, de los que se



conoce el modo de acción a nivel molecular frente a los microorganismos, de los conservantes únicamente se conocen de forma generalizada los puntos de actuación. Muchos actúan desnaturalizando las proteínas o afectando a la permeabilidad de la membrana de los microorganismos y, por tanto, bloqueando el transporte y la generación de energía.

En la UE, el uso de conservantes en productos cosméticos está regulado en el anexo V del Reglamento (CE) Nº 1223/2009, donde se establecen las concentraciones máximas permitidas de cada conservante en dichos productos. Dentro de los conservantes listados se incluyen distintas familias de compuestos como los parabenos, los conservantes bromados, los conservantes fenólicos o el triclosán.

### 1.2.2.3. Fragancias

Por fragancia se entiende una mezcla de compuestos químicos, que permiten diferenciar e identificar los distintos productos por el aroma que desprenden. Sin embargo, es habitual hablar de fragancia, refiriéndose a un único compuesto de esta familia. Los almizcles (del inglés, *musks*) son una clase de ingrediente de las fragancias presentes en numerosos PCPs y productos de limpieza. Son compuestos de olor penetrante y persistente que no sólo contribuyen a darle un olor distintivo al producto de consumo, sino que también sirven como fijadores del perfume para mantener la integridad del aroma (García-Jares et al., 2002; Reiner y Kannan, 2006). Los almizcles naturales se obtienen de plantas o de glándulas de ciertos animales y se han usado en Asia desde hace más de 5000 años en la medicina tradicional y para la elaboración de perfumes. En Europa, el uso de este tipo de fragancias comenzó a reducirse a principios de la década de los 90 debido al alto coste que tenía el introducirlas en los perfumes y a que algunas de las especies de animales de las que se extraen, como el ciervo almizclero, estaban en peligro de extinción. Por todo ello, empezaron a ser sustituidas por fragancias sintéticas, más fáciles y económicas de obtener que sus equivalentes naturales (Sommer, 2004).

Actualmente, la mayor producción de fragancias se centra en el sector cosmético, destacando los perfumes, pero también se encuentran en multitud de

productos de consumo como champús, jabones, lociones, detergentes, suavizantes, productos de limpieza, ambientadores, aditivos en tabaco, herbicidas, cebos de pesca y/o caza, etc. (Hutter et al., 2010). Debido a la naturaleza del uso de los perfumes y otros PCPs existe un alto potencial de exposición humana a estos compuestos que, además, entrarán en gran medida en el medio ambiente durante o después de su uso.

Según su estructura química, las fragancias sintéticas se pueden dividir en tres grandes grupos: nitrogenadas, policíclicas o macrocíclicas.

· Las fragancias sintéticas nitrogenadas aparecieron por primera vez a finales del siglo XIX como sustituto económico de las fragancias naturales. Dentro de este grupo de sustancias, denominado frecuentemente como “nitromusks”, destacan la “musk xylene” y la “musk ketone” (García-Jares et al., 2009). Este grupo de fragancias fueron las primeras que hicieron saltar la alarma sobre su potencial toxicidad. Se detectaron por primera vez en seres humanos en los años 90, demostrándose en estudios posteriores su alto potencial de bioacumulación (Rimkus, 1999). Algunas de ellas fueron prohibidas y retiradas del mercado a finales de los años 90 debido a su neurotoxicidad y genotoxicidad. En 2014 la UE prohibió el uso y comercialización de la “musk xylene”, catalogándola como sustancia muy persistente y bioacumulable. La probada toxicidad y alto potencial de bioacumulación de las fragancias nitrogenadas, características que implican efectos perjudiciales tanto para la salud humana como para el medio ambiente, han provocado una drástica caída de su producción a lo largo de los años a favor de las fragancias policíclicas.

· Las fragancias sintéticas policíclicas se desarrollaron a mediados del siglo XX y durante los últimos años han ido sustituyendo o reemplazando a las “nitromusk”. La familia de las fragancias policíclicas está formada por sustancias cuya estructura obedece básicamente a sustituciones por grupos metilo de dos moléculas principales: indano y tetralina. De todas las fragancias presentes en el mercado, las más importantes por volumen de producción (miles de toneladas anuales) son galaxolide y tonalide, repartiéndose el 95 % de la producción mundial de las fragancias policíclicas (Clara et al., 2011). Aunque aparentemente este grupo de fragancias tenía una menor

toxicidad que las “nitromusks”, desde el punto de vista de sus propiedades, son muy solubles en disolventes orgánicos, lipofílicas y persistentes en tejidos. Presentan alta estabilidad química, baja biodegradabilidad y un alto potencial de bioacumulación, por lo que también son potencialmente perjudiciales para la salud humana y el medioambiente.

· El grupo de las fragancias macrocíclicas está compuesto por una mezcla de compuestos sintéticos y naturales. Básicamente son cetonas macrocíclicas (origen animal), lactonas y bis-lactonas (origen vegetal). Presentan estructura y propiedades similares a los compuestos aromáticos naturales, por ello se puede producir una fácil descomposición microbiana de las mismas, convirtiéndolas en compuestos de estabilidad química reducida y mayor biodegradabilidad. Estas características convierte a este grupo de fragancias en menos perjudiciales para la salud y el medio ambiente, sin embargo, su coste de producción es mucho más elevado, por lo que todavía es muy frecuente el uso de las fragancias policíclicas.

### **1.3. Microalgas: importancia ecológica y uso en estudios de ecotoxicidad**

El fitoplancton es el componente autótrofo de la comunidad planctónica y engloba organismos fotosintéticos procariontes (cianobacterias) y eucariotes (microalgas). El término plancton proviene del griego *planktos* (errante), por lo que son organismos de pequeño tamaño que viven suspendidos en la columna de agua, a merced de los movimientos de ésta.

Las microalgas, por tanto, son un grupo muy diverso de microorganismos eucariotes fotoautótrofos que constituyen una parte fundamental del fitoplancton. Poseen una morfología y composición variable y son, en general, unicelulares, aunque algunas especies pueden formar cadenas, cenobios o colonias. Son organismos ubicuos en la mayoría de los ambientes; aunque se encuentran especialmente en ambientes acuáticos, tanto marinos como continentales, pero también pueden estar presentes en el suelo, nieve o asociaciones simbióticas con hongos, plantas y animales. Contienen clorofilas y otros pigmentos por lo que son capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica

y de ellas depende la mayor parte de la productividad primaria de los ecosistemas acuáticos. Se estima que el fitoplancton (microalgas y cianobacterias) es el responsable del 95 % de la fotosíntesis que se realiza en el océano y del 50 % de la producción primaria global del planeta, fijando varios miles de millones de toneladas de carbono al año en las masas de agua oceánicas y continentales, generando de este modo gran parte del oxígeno presente en la atmósfera y que sustenta la vida en este planeta, contribuyendo por lo tanto a paliar significativamente el efecto invernadero (Behrenfeld et al., 2001; González-López et al., 2011).

Por todo lo expuesto anteriormente, podríamos concluir que la importancia ecológica de estos microorganismos radica principalmente en dos de sus características fisiológicas:

- Su capacidad para captar la luz y utilizar su energía para la asimilación de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y otros nutrientes inorgánicos a su propia biomasa, constituyendo, por tanto, el primer eslabón de la cadena trófica.
- Su producción de oxígeno ( $\text{O}_2$ ), como subproducto de la fotosíntesis, que representa la mayor parte de la producción total de oxígeno en los sistemas acuáticos.

Además, el fitoplancton es un componente indispensable del ciclo biogeoquímico de distintos nutrientes como el carbono, nitrógeno o fósforo.

El conocimiento cada vez mayor de los efectos perjudiciales de la contaminación sobre el medio ambiente ha hecho cambiar la estrategia tradicional de búsqueda de métodos de restauración o recuperación ambiental hacia una estrategia de prevención de la entrada de potenciales contaminantes en el medio. Con este cambio de actitud, surge la necesidad de desarrollar métodos adecuados que permitan evaluar la presencia de contaminantes, así como estudiar y predecir la toxicidad de las diversas sustancias que pueden ser liberadas al ambiente sobre los organismos acuáticos; lo

que se ha convertido en uno de los principales objetivos dentro de la investigación ecotoxicológica.

El término ecotoxicología fue acuñado por Truhaut en 1969 (recogido en Truhaut, 1977) para definir un nuevo campo de estudio relacionado con los efectos dañinos de los compuestos químicos (toxicología) dentro del contexto de la ecología. Hasta ese momento, el objetivo de la toxicología ambiental había estado centrado en los efectos peligrosos de los compuestos químicos sobre los seres humanos. Sin embargo, la toxicología ambiental, en su sentido más amplio, abarca también el estudio de dichos efectos sobre los distintos ecosistemas, lo que es objeto de estudio de la ecotoxicología. La ecotoxicología se centra en los efectos perjudiciales de los productos químicos sobre el medio ambiente, abarcando distintos niveles, desde organismos individuales hasta el nivel de población, comunidad o ecosistema.

Las estrategias de ecotoxicología y evaluación de riesgos se basan en un proceso por etapas que ha sido adoptado por ejemplo en el marco de implementación de la normativa de la Unión Europea. La UE ha demostrado su preocupación sobre la presencia de químicos en el medio ambiente y los efectos ambientales adversos de los distintos contaminantes, regulando el registro de estas sustancias y su colocación en el mercado. Para ello establece la obligación de realizar ensayos previos de los potenciales efectos negativos de los ingredientes activos sobre organismos no diana y reconoce la necesidad de generar una base de datos ecotoxicológicos sobre estos agentes (Segner, 2011, Gregorio y Chèvre, 2014, Storck et al., 2017). Esto se contempla en el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (en adelante denominado REACH, por sus siglas en inglés; *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*), que tiene como objetivo principal mejorar la protección para la salud humana y el medio ambiente frente al riesgo que puede conllevar la fabricación, comercialización y uso de las sustancias y mezclas químicas. Este reglamento es de aplicación para todas las sustancias químicas presentes en la vida diaria ya sea como tales, en forma de mezclas o contenidas en artículos, siendo, por tanto, de aplicación en sectores económicos de índole diversa. Para cumplir con las disposiciones del REACH las empresas deben

identificar y gestionar los riesgos asociados a las sustancias que fabrican y comercializan en la UE, evaluando los riesgos para la salud y el medio ambiente. En este proceso los primeros datos de toxicidad suelen ser de organismos acuáticos y suelen servir para evaluar riesgos tanto para los ecosistemas acuáticos como terrestres a no ser que existan datos concluyentes de la partición del tóxico en suelos o sedimentos. Los estudios de ecotoxicidad más comunes en las últimas décadas para el seguimiento de los contaminantes acuáticos a corto plazo han sido los ensayos de letalidad en peces, los cuales han sido criticados por razones económicas, logísticas y éticas (Fentem y Balls, 1993).

Ante la necesidad de buscar nuevos métodos y organismos adecuados y eficaces para la evaluación de la toxicidad de los diferentes contaminantes, se comenzaron a utilizar los microorganismos como indicadores biológicos de la contaminación en estudios de ecotoxicidad. La utilización de organismos de niveles más bajos de la cadena trófica acuática, tales como bacterias y microalgas, resulta ventajoso desde todos los puntos de vista planteados. Los microorganismos son, generalmente, los primeros en ser afectados por las descargas de los diferentes contaminantes en el ambiente o ecosistema, ya que están directamente en contacto con el medio, separados sólo por una membrana y/o pared celular. En concreto, las microalgas juegan un papel muy importante en el equilibrio de los ecosistemas acuáticos, donde constituyen un componente fundamental del primer nivel de la cadena trófica y la principal entrada de energía al ecosistema. Cualquier perturbación en la población fitoplanctónica y/o alteración en su producción primaria podría repercutir severamente sobre los niveles superiores de la cadena trófica, conllevando alteraciones en el flujo de energía que podrían producir modificaciones estructurales y funcionales en el ecosistema (Campanella et al., 2001; Lürling y Roessink, 2006).

En general, las microalgas son consideradas indicadores útiles de la calidad ambiental debido a las siguientes características:

- Su representatividad como indicadores de la red fitoplanctónica.

- Son habitantes ubicuos de todas las masas de agua.
- Su papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos del carbono y del nitrógeno.
- En general, la facilidad y el bajo coste del mantenimiento de los cultivos microalgales en condiciones de laboratorio.
- Su pequeño tamaño.
- Su gran facilidad y rapidez de muestreo en los ecosistemas.
- Manifiestan sensibilidad ante un amplio grupo de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos.
- Poseen gran capacidad de bioacumulación de sustancias xenobióticas.

Por todo ello, las microalgas son habitualmente utilizadas en bioensayos de toxicidad en laboratorio. Los bioensayos (test ecotoxicológicos o biotests), se definen como métodos que emplean células vivas, tejidos, organismos o comunidades, para evaluar los efectos producidos por la exposición a productos químicos. Estos bioensayos, a su vez, pueden clasificarse en función de su campo de aplicación (condiciones de laboratorio o de campo), niveles de organización biológica o duración de la exposición (Forbes y Forbes, 1994).

La historia de los ensayos biológicos se inicia en 1924, cuando Carpenter (Carpenter, 1924) empezó a estudiar la toxicidad de metales pesados en peces en un área con actividades mineras. Los bioensayos con algas se comenzaron a utilizar hace más de cuatro décadas, siendo realizado el primer trabajo en 1971 (Burrows, 1971). Estos bioensayos han ido cobrando cada vez más importancia ya que pueden contribuir a dar una información muy valiosa sobre los efectos de los contaminantes ambientales, de modo que la dirección o asesoramiento ambiental tendrían en estos microorganismos un temprano y adecuado sistema de alarma que permitiría la toma de decisiones para prevenir tales efectos. De hecho, los ensayos de inhibición del crecimiento microalgal están incluidos dentro los bioensayos de toxicidad obligados para el registro y notificación de nuevos productos químicos en la UE (Haglund, 1997, Girling et al., 2000, Pascoe et al., 2000). En los últimos años se ha establecido la

idoneidad de la utilización de cultivos de microalgas para ensayos biológicos y fisiológicos, demostrándose que estos microorganismos son muy adecuados para ensayar los efectos tóxicos de distintos contaminantes utilizando pruebas estandarizadas (ISO 8692:2012; OECD 201, 2011).

Los bioensayos unialgales llevados a cabo en el laboratorio son los más comunes y los que normalmente se requieren para evaluar la toxicidad de nuevas sustancias que buscan su entrada en el mercado. Se ha demostrado que la utilización de una serie de bioensayos de toxicidad llevados a cabo en el laboratorio con organismos de ensayo adecuados es generalmente suficiente para predecir el riesgo ambiental que suponen los diferentes agentes contaminantes en los ecosistemas acuáticos (Girling et al., 2000, Pascoe et al., 2000). Estos bioensayos se pueden realizar utilizando cultivos estáticos (método *batch*), como los utilizados en el desarrollo de esta tesis, en los que el tóxico se añade al inicio del ensayo y no existe ningún tipo de renovación del medio de cultivo ni regulación de la concentración del agente contaminante, o cultivos continuos, en los que existe una renovación del medio de cultivo a una determinada tasa.

La mayor parte de los ensayos de toxicidad con microalgas realizados en laboratorio se han realizado con microalgas dulceacuícolas, existiendo relativamente pocos bioensayos que puedan ser calificados como estándar en ambientes marinos (Debelius et al., 2008). Las microalgas verdes dulceacuícolas de los géneros *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Selenastrum* son algunas de las más utilizadas. En concreto, el bioensayo microalgal más ampliamente utilizado es el basado en la inhibición del crecimiento de las microalgas *Pseudokirchneriella subcapitata* (antes conocida como *Selenastrum capricornutum*) y *Scenedesmus subspicatus* (ISO 8692:2012) (Haglund, 1997). También existen trabajos realizados con diversas especies de cianobacterias, siendo *Anabaena*, *Nostoc* y *Microcystis* los géneros más comunes en estos estudios. En el medio marino, las algas verdes y diatomeas son las microalgas más comúnmente usadas en los ensayos de toxicidad (Moreno-Garrido et al., 2000). En concreto existe un ensayo estandarizado de



inhibición del crecimiento de las diatomeas marinas *Skeletonema* sp. y *Phaeodactylum tricornutum* (ISO 10253:2016).

Sin embargo, las algas todavía están poco representadas como organismos de ensayo en los métodos estandarizados y normalmente recomendados. Existen relativamente pocas especies microalgales que se hayan estudiado para su utilización en ensayos de toxicidad y las que se usan, han sido elegidas por su facilidad de cultivo más que por su sensibilidad a los contaminantes. Dado que no existe ninguna especie de microalga que sea siempre la más sensible y ecológicamente representativa, es necesario introducir nuevas especies que puedan ser utilizadas en bioensayos de toxicidad, de modo que en cada caso se pueda elegir el método más apropiado, teniendo en cuenta la naturaleza del medio acuático que se pretende proteger y los organismos que habitan naturalmente en dicho medio, para que el sentido ecológico de los ensayos realizados en el laboratorio sea cada vez mayor.

Para este estudio, se ha seleccionado la microalga verde marina *Tetraselmis suecica*. Es una microalga común de aguas costeras y estuarios que además, es muy utilizada en acuicultura como cultivo auxiliar para el alimento de rotíferos, *Artemia* y larvas de moluscos y crustáceos (Fábregas et al., 2001). Es una especie de crecimiento rápido y fácil de cultivar en laboratorio. Debido a su elevada productividad celular, posee un gran potencial de utilización en diversos sectores de interés comercial. Además, y lo más importante para este tipo de estudios, ha mostrado sensibilidad frente a los distintos tipos de contaminantes ensayados y su corto ciclo de vida, permite detectar cambios ambientales a corto plazo debido a su rápida respuesta.

Dado que las diferentes especies de microalgas difieren notablemente en sus respuestas ante agentes tóxicos, los bioensayos realizados con una sola especie microalgal son de limitada aplicabilidad en la evaluación de los efectos de estos contaminantes ambientales sobre las comunidades algales, que están formadas por varias especies con distintas sensibilidades. Sin embargo, estos ensayos de toxicidad han sido el origen de muchos datos biológicos para la evaluación del riesgo de

diferentes contaminantes y pueden seguir proporcionando información muy valiosa (Ma y Chen, 2005). Por otro lado, cada vez se utilizan más las baterías de bioensayos, realizados al mismo tiempo e independientemente con diferentes especies de microalgas pero con el mismo tóxico. Estas baterías permiten así comparar la sensibilidad de diferentes especies microalgales, o incluso de diferentes cepas de la misma especie, a un determinado agente contaminante.

### **1.3.1. Parámetros estudiados en los bioensayos con microalgas**

Como se ha comentado anteriormente, las microalgas se utilizan como indicadores biológicos de la contaminación en estudios ecotoxicológicos, en los que se pretende determinar la relación entre la cantidad de compuesto químico a la que el organismo está expuesto y la naturaleza y grado de sus efectos perjudiciales. La relación dosis-respuesta proporciona la herramienta necesaria para el análisis de los potenciales peligros que presentan los productos químicos para el medio ambiente.

Para cuantificar la toxicidad de un compuesto se puede recurrir a diferentes parámetros, siendo el más utilizado la mortalidad o el crecimiento, de modo que el 95 % o más de los trabajos publicados lo incluyen (van Wezel y van Vlaardingen, 2004; Corrêa et al., 2009). Es un parámetro general, que refleja el estado fisiológico de las células (Geoffroy et al., 2007) y se puede monitorizar directamente mediante el recuento celular en cámara al microscopio o en contadores electrónicos de partículas. También se pueden hacer estimas indirectas, ya que se puede correlacionar el crecimiento con la turbidez del cultivo, el peso seco o la cantidad de clorofila *a* (por fluorimetría o espectrofotometría).

Además del crecimiento, en los ensayos de ecotoxicidad con microalgas, también se han utilizado otros parámetros o efectos fisiológicos y bioquímicos, a nivel de población o comunidad.

La exposición de las células microalgales a agentes contaminantes puede inducir alteraciones en la morfología celular, tanto en lo que se refiere al volumen y forma de las células como a alteraciones producidas a nivel subcelular (cambios en la morfología de cloroplastos o mitocondrias, aparición de inclusiones

citoplasmáticas, alteración de las membranas...). Cambios estructurales y ultraestructurales que pueden ser estudiados por microscopía óptica y electrónica (Yang et al., 2002).

Dada la naturaleza fotosintética de estos microorganismos, el estudio de parámetros relacionados con la asimilación fotosintética de carbono también ha sido utilizado en este tipo de investigaciones (Macinnis-Ng y Ralph, 2003, Strom et al., 2009). Desde hace relativamente poco tiempo se ha empezado a utilizar también la fluorescencia de la clorofila  $a$  como un indicador eficaz del estado fisiológico del aparato fotosintético, proporcionando información básica sobre el funcionamiento de la fotosíntesis. Cuando un organismo fotosintético se expone a la luz, se produce una emisión de fluorescencia que se origina principalmente a partir de la clorofila  $a$  del fotosistema II (PSII). Fotosíntesis y fluorescencia son procesos competitivos, de modo que si células microalgales adaptadas a la oscuridad son iluminadas, la emisión de fluorescencia alcanza rápidamente un valor máximo y empieza a disminuir con el comienzo del transporte electrónico (efecto Kautsky) (Mallick y Mohn, 2003). En condiciones óptimas, la mayor parte de la energía lumínica absorbida por la clorofila es disipada vía conversión química, con una pequeña proporción dedicada a la emisión de fluorescencia y calor, pero la capacidad fotosintética del organismo se puede ver reducida bajo condiciones de estrés, dando lugar a un incremento de la emisión de fluorescencia.

La cuantificación del contenido celular de diferentes pigmentos fotosintéticos, fundamentalmente clorofilas y carotenoides, por determinación espectrofotométrica también puede proporcionar información sobre el estado fotosintético de las microalgas y, de hecho, este parámetro se ha utilizado en muchos trabajos como biomarcador de exposición a contaminantes como los herbicidas en algas (Couderchet y Vernet, 2003, Prado et al., 2009b).

Los metabolitos pueden considerarse como los productos finales de los procesos regulatorios celulares y sus niveles pueden interpretarse como la última

respuesta de los sistemas biológicos a los cambios genéticos y ambientales (Jamers et al., 2009).

Un índice básico muy utilizado es la relación C/N, que se ha relacionado con la tasa de crecimiento de una manera inversamente proporcional (Laws y Chalup, 1991; Prado et al., 2009b; Fernández-Naveira et al., 2016).

Los análisis de la composición bioquímica para caracterizar la respuesta metabólica de un organismo frente a los estímulos o agentes estresantes presentes en el ambiente, han sido poco utilizados hasta la fecha en ensayos de toxicidad con microalgas. Algunos compuestos bioquímicos utilizados han sido el contenido celular de proteínas (Battah et al., 2001), el contenido celular de carbohidratos (Kobbia et al., 2001), el contenido celular de lípidos (Yang et al., 2002) o ácidos grasos (El-Sheekh et al., 2013).

La toxicidad ejercida por los contaminantes ambientales también se puede reflejar en diversas actividades enzimáticas, que pueden ser inducidas o inhibidas por la presencia del agente tóxico. Generalmente se suelen estudiar actividades enzimáticas relacionadas con mecanismos antioxidantes (catalasa, peroxidasa, glutatión reductasa, etc.), pues los contaminantes ambientales suelen desencadenar un estrés oxidativo que puede inducir mecanismos antioxidativos tanto enzimáticos como no enzimáticos, que de este modo se pueden usar como biomarcadores de la toxicidad (Geoffroy et al., 2003). También se estudian otras actividades enzimáticas, como la actividad esterasa inespecífica, que se puede utilizar como un indicador del estado físico y metabólico de la célula (Dorsey et al., 1989, Gilbert et al., 1992). Por otro lado, también hay estudios de actividades enzimáticas más particulares, como diversos enzimas relacionados con el metabolismo del nitrógeno (Singh y Tiwari, 1988, Prado et al., 2009b, Fernández-Naveira et al., 2016).

Dentro de las tecnologías más recientes aplicables al campo de la ecotoxicología nos encontramos con la citómica, que se define como el estudio de los fenotipos moleculares de las células individuales en combinación con una exhaustiva

extracción informática del conocimiento así obtenido (Herrera et al. 2007). Esta disciplina tiene como objetivo el conocimiento del diseño molecular y la funcionalidad de los citomas (sistemas y subsistemas celulares y los componentes funcionales del organismo) mediante el análisis célula a célula, una aproximación que evita la pérdida de información que caracteriza a otras metodologías que obtienen valores promedios a partir del análisis simultáneo de números elevados de células o de homogeneizados de tejidos.

La citometría de flujo (CMF) es una poderosa metodología citómica que permite cuantificar simultáneamente varios parámetros biológicos en la misma célula a gran velocidad, evitando la pérdida de información que caracteriza a otras metodologías en las que se obtienen valores promedios a partir del análisis a nivel poblacional de un número elevado de células. Permite el análisis *in vivo* de los organismos unicelulares, caso de las microalgas, en condiciones que perturban mínimamente el hábitat y estado fisiológico del microorganismo. Además, la utilización de células enteras presenta como ventaja evidente el que puedan detectar toda una serie de reacciones complejas que sólo pueden existir en una célula intacta metabólicamente activa. Esta técnica permite, por un lado, el estudio de propiedades inherentes a la célula como el volumen, complejidad intracelular y la autofluorescencia; por otro lado, mediante la utilización de colorantes fluorescentes químicamente específicos, puede proporcionar información acerca de las condiciones fisiológicas *in vivo* de las células. De este modo, se pueden estudiar parámetros como la viabilidad y actividad celular, la producción de especies reactivas de oxígeno, el potencial de membrana citoplasmática y mitocondrial, el pH intracelular, entre otros.

Las aportaciones de muchos grupos y, en particular, de nuestro grupo de investigación sobre el análisis toxicológico mediante CMF de poblaciones de microalgas, tanto marinas como dulceacuícolas, tras su exposición *in vitro* a xenobióticos, han dejado clara su relevancia medioambiental y se ha contribuido a que

se considere la utilización de esta técnica con una mayor frecuencia en el campo de la ecotoxicología.

## **2. OBJETIVOS**

---





A la vista de lo expuesto anteriormente, se plantea como objetivo general de este trabajo, estudiar la toxicidad ejercida por diversos contaminantes emergentes, pertenecientes a los grupos más representativos, sobre la microalga marina *Tetraselmis suecica*, mediante la aplicación de bioensayos por citometría de flujo (CMF) que permiten la caracterización de los potenciales efectos tóxicos de estos contaminantes en el medio marino. Este objetivo general puede concretarse en los siguientes objetivos específicos:

1. Determinación del efecto tóxico sobre el crecimiento de *T. suecica* provocado por distintos fármacos y productos de cuidado e higiene personal.
2. Estudio de las alteraciones citómicas provocadas por los diferentes contaminantes emergentes ensayados.
3. Evaluación de la sensibilidad y aplicabilidad de los protocolos de CMF utilizados, en la determinación de la potencial citotoxicidad de los contaminantes emergentes.

La identificación, caracterización y evaluación de los efectos de estos compuestos sobre algunos de los parámetros específicos considerados, debería posibilitar la definición, establecimiento y sistematización de marcadores específicos de contaminación marina y determinar su aplicabilidad en estudios ecotoxicológicos.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

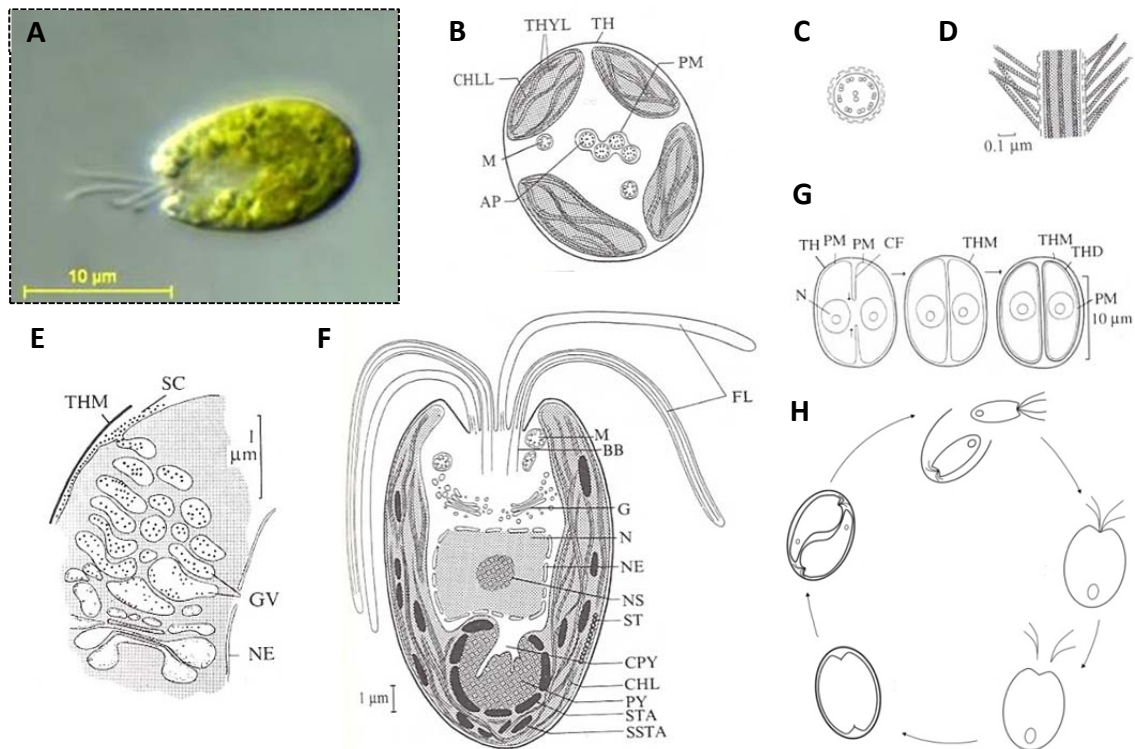
---



#### 3.1. Descripción de *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher

*T. suecica* pertenece a la clase *Prasinophyceae*, dentro de la división *Chlorophyta*. Es una especie marina unicelular móvil por flagelos de color verde, que contiene clorofila *a* y *b*. Posee una forma generalmente ovoide o elipsoidal, ligeramente aplanada en sección transversal y su tamaño celular está comprendido entre 10 – 15  $\mu\text{m}$  de longitud y entre 7 – 9  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 1). Presenta cuatro flagelos iguales e isodinámicos que salen de una invaginación apical de la porción anterior de la célula que está ubicada en la misma dirección en la que avanza (Fig. 1A, B). La estructura de los flagelos es pancronemática y los mastigonemas recubren el flagelo en toda su longitud, salvo en su parte terminal (Droop, 1969) (Fig. 1C, D). La cubierta celular está formada por una teca compuesta por 2 - 3 estratos producidos por partículas escamosas de aspecto cristalino que derivan del aparato de Golgi (Fig. 1E). Posee un núcleo central y un plasto parietal acopado, lobulado en la parte anterior, con un pirenoide basal rodeado de almidón y penetrado por invaginaciones citoplasmáticas constituidas por un brazo simple que se ramifica. Generalmente presenta un estigma o mancha ocular de color rojizo localizado a un lado de la célula, constituido por dos capas de gránulos osmiofílicos separados por tilacoides simples hinchados que parecen carecer de contenido (Fig. 1F). La reproducción se realiza por división celular binaria longitudinal, momento en el cual las células pierden el estado móvil, y las dos células hijas ya están completamente flageladas antes de su liberación de la teca parental (Butcher, 1959) (Fig. 1G, H).

A partir de los estudios de células en cultivo, además del estado móvil, se consideran dos estados inmóviles: un estado vegetativo, considerado como un "falso quiste" (frecuentemente obtenido en cultivos envejecidos) y el estado de "quiste verdadero", mucho menos común (Bold y Wynne, 1985; Chrétiennot-Dinet, 1990). Los quistes verdaderos contienen 4 células y la pared es ornamentada. La formación de quistes ocurre bajo condiciones desfavorables, como deficiencia prolongada en nutrientes o pH extremos (Regan, 1988).



**Figura 1.** *Tetraselmis suecica*. Imagen de microscopía óptica de *T. suecica* **(A)**. Sección transversal de la parte apical de la célula donde se encuentra la invaginación de la que salen los flagelos **(B)**. Sección transversal de un flagelo mostrando la estructura 9+2 del axonema **(C)**. Sección longitudinal de un flagelo con mastigonemas **(D)**. Aparato de Golgi produciendo partículas escamosas enviadas a la superficie celular donde se ensamblan para formar la teca **(E)**. Sección longitudinal de la célula mostrando la ultraestructura celular **(F)**. Fases terminales de la división celular (fisión binaria longitudinal) **(G)**. Esquema del ciclo celular de *T. suecica* (Abiusi et al., 2014) **(H)**.

Se muestra: AP: hendidura apical; BB: cuerpo basal; CF: surco de escisión; CHL: cloroplasto; CHLL: lóbulo del cloroplasto; CPY: canal citoplasmático en el pirenoide; FL: flagelo; G: aparato de Golgi; GV: vesículas de Golgi; M: mitocondria; N: núcleo; NE: envoltura nuclear; NS: nucléolo; PM: membrana plasmática; PY: pirenoide; SC: ensamblaje de partículas escamosas para formar la teca; STA: gránulo de almidón; ST: estigma; TH: teca; THD: teca de célula hija; THM: teca de célula madre; THYL: tilacoides (van den Hoek et al., 1995).

*T. suecica* es una microalga común en aguas costeras y de estuarios y soporta amplios márgenes de salinidad y temperatura. Es una especie muy utilizada en acuicultura como alimento vivo de rotíferos, *Artemia* y larvas de moluscos y

crustáceos, con un valor nutritivo considerable por su excelente fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, así como por ser fuente de minerales y vitaminas (Fábregas et al., 2001).

En los últimos años se ha aprovechado la composición y facilidad con la que se puede manipular para producir metabolitos de interés comercial. Es una de las microalgas con más potencial para la producción de biodiesel, no tanto por la productividad de lípidos que alcanza, sino por su alta productividad celular y por la facilidad de su cultivo a gran escala en sistema continuo (Chisti, 2007). Otro campo emergente es la producción de antioxidantes a partir de microalgas, ya que estos compuestos se están aplicando en sectores diversos como el cosmético, alimentario y sanitario. Uno de los compuestos bioactivos más destacables que pueden ser extraídos de la biomasa de esta microalga es la clorofila, que presenta interesantes aplicaciones como colorante natural con propiedades antioxidantes y antimutagénicas (Lee et al. 2009).

La cepa de *T. suecica* utilizada en el presente trabajo fue aislada de las aguas de la Ría de Arousa (NO España) (Fábregas, 1982).

#### **3.2. Cultivo de *Tetraselmis suecica***

Los cultivos microalgales se realizan en agua de mar natural, filtrada por 0,22  $\mu\text{m}$  y esterilizada en autoclave a 120  $^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos, enriquecida con el medio de cultivo GoldMedium (AQUALGAE S.L.) basado en la composición del Algal-1 (Herrero et al., 1991). Este medio de cultivo se compone de dos soluciones, una de macronutrientes y otra de oligoelementos y vitaminas, que se realizan en agua destilada natural y se autoclavan por separado a 120  $^{\circ}\text{C}$  durante 20 min; posteriormente se mezclan y se almacenan a 4  $^{\circ}\text{C}$  en oscuridad. En la Tabla 1 se especifica la composición de cada compuesto en el medio de cultivo final.

**Tabla 1.** Composición del medio de cultivo Algal-1 (Herrero et al., 1991).  
Concentración de cada compuesto ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en el medio de cultivo final.

	Compuesto	Concentración ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Macronutrientes	$\text{NaNO}_3$	340,00
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	31,20
	$\text{Na}_2\text{SiO}_3$	30,50
Oligoelementos	Citrato férrico	5,00
	$\text{ZnCl}_2$	0,14
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,20
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,24
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,02
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025
Vitaminas	Tiamina ( $\text{B}_1$ )	0,035
	Cianocobalamina ( $\text{B}_{12}$ )	0,003
	Biotina ( $\text{B}_7$ )	0,005

Las cepas se mantienen en condiciones axénicas en placas Petri con medio de cultivo sólido con agar al 1,5 % y en medio líquido en tubos *Kimax* de 40 mL no aireados. Los cultivos *stock* se realizan en botellas de vidrio de 1 L y se mantienen con aireación en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas de luz y temperatura. Estos cultivos *stock* se renuevan periódicamente para mantener las microalgas en fase de crecimiento exponencial.

La iluminación, de aproximadamente  $70 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , es proporcionada por tubos fluorescentes *Philips TLD* de 36 W y aplicada con un ciclo de 12 h de luz y 12



h de oscuridad. La temperatura de la cámara se mantiene constante a  $18 \pm 1$  °C. La agitación de los cultivos se realiza mediante burbujeo constante de aire, impidiendo que las células sedimenten y la formación de gradientes de nutrientes y/o de intensidad lumínica, obteniendo de este modo un crecimiento más uniforme (Raven y Geider, 1988). La aireación proporciona, además, un aporte de CO<sub>2</sub> (0,033 % en aire) que actúa como fuente de carbono y colabora en el tamponamiento del medio de cultivo. El aire inyectado a los cultivos se filtra mediante filtros *Millipore FG* de 0,22 µm de tamaño de poro.

### **3.3. Contaminantes emergentes**

#### **3.3.1. Fármacos**

##### **3.3.1.1. Antibióticos**

La acuicultura es una industria que ha experimentado un rápido crecimiento en los últimos años en respuesta al dramático incremento poblacional mundial y la creciente demanda de alimentos. Como resultado de la actividad en las plantas de cultivo, se generan efluentes que albergan una compleja mezcla de compuestos químicos que van a parar a los ecosistemas acuáticos.

Las enfermedades infecciosas se han convertido en un factor limitante para el desarrollo de la acuicultura, siendo la causa principal de las pérdidas económicas debido a la mortalidad de los animales, el consecuente descenso de la producción y los costes de control y tratamiento de dichas afecciones (Blanco et al., 2004). Dada la importancia de este sector productivo, ha sido esencial el desarrollo y empleo de fármacos para combatir a los microorganismos responsables de las enfermedades. Para el control y erradicación de bacterias patógenas, la estrategia más empleada sigue siendo el uso de antibióticos de amplio espectro. Los antibióticos se utilizan en acuicultura como herramienta, no solo terapéutica, sino también profiláctica y su uso abusivo, puede traer consigo efectos potencialmente dañinos para la salud humana, animal y también para el medio ambiente (Cabello, 2006), por lo que en los últimos

años han sido reconocidos como contaminantes ambientales emergentes en los ambientes acuáticos (Kümmerer, 2009; Aminov, 2010).

Los alimentos medicados constituyen la principal vía de administración de fármacos en peces por su fácil manejo y bajo coste, pero esta vía tiene un elevado riesgo de contaminar el ambiente acuático debido a la ingesta parcial de la dosis administrada o su absorción incompleta (Burka et al., 1997; Díaz-Cruz et al., 2003). Se calcula que entre un 70 y un 80 % de los antibióticos administrados en plantas de cultivo de peces llega al medio ambiente (Schneider, 1994; Hektoen et al., 1995). En el caso de las *hatcheries* de moluscos, es común la adición de antibióticos directamente al agua de los tanques larvarios.

A la vista de lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo se seleccionaron tres antibióticos frecuentemente utilizados en acuicultura con el fin de evaluar su potencial toxicidad en la microalga marina *T. suecica*.

El cloranfenicol (2,2-dichloro-N-[1,3-dihydroxy-1-(4-nitrophenyl)propan-2-yl]acetamide; CLO) es un antibiótico de amplio espectro antimicrobiano que inhibe la síntesis proteica a nivel de la subunidad 50 S del ribosoma bacteriano, impidiendo la formación de puentes peptídicos en la cadena de elongación. Es un antibiótico todavía autorizado en medicina humana y ha sido utilizado con frecuencia en las *hatcheries* para el control del crecimiento microbiano en cultivos larvarios de pectínidos, sobre todo en países de Sudamérica (Uriarte et al., 2001). Sin embargo, ya en el Anexo IV del Reglamento (CEE) Nº 2377/90 de 1990 se incluye el cloranfenicol como sustancia que no puede utilizarse en especies destinadas a la alimentación humana debido a que no pueden determinarse niveles seguros de residuos. La ingestión de cloranfenicol por medio del consumo de productos pesqueros que contienen residuos, podría conllevar riesgos para los seres humanos con graves repercusiones para su salud. La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (US FDA), en 2002 también prohíbe su uso en la cría de animales destinados a la producción de alimentos. A pesar de su prohibición, el amplio espectro de actividad, su fácil disponibilidad y su bajo coste continúa atrayendo a algunos productores (Lai et al.,

2009), pudiendo llegar al medio marino residuos de este compuesto, por esta u otras vías.

El florfenicol ([R-(R\*,S\*)]-2,2-Dichloro-N-[1-(fluoromethyl)-2-hydroxy-2-[4-(methylsulfonyl)phenyl]ethyl]acetamide; FLO) es un antibacteriano de amplio espectro de la familia de los fenicoles. Químicamente es un derivado monofluorado del tianfenicol, un análogo del cloranfenicol que posee un rango de actividad similar. Sin embargo, el florfenicol no conlleva riesgo de inducir anemia aplásica en humanos, fenómeno asociado con el cloranfenicol. Su sitio de acción también es la subunidad ribosomal mayor (50 S), impidiendo la formación del enlace peptídico e interrumpiendo la síntesis proteica en el segundo paso de su fase de elongación (Marconi et al., 1990).

La oxitetraciclina ((4S,4aR,5S,5aR,6S,12aS)-4-(dimetilamino)-3,5,6,10,11,12a-hexahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,12,12a-octahidro-2-tetracencarboxamida; OTC) es un antibiótico de amplio espectro perteneciente a la familia de las tetraciclinas cuyo mecanismo de acción se basa en inhibir la síntesis proteica bacteriana fijándose a la subunidad 30 S del ribosoma. De este modo, impide la fijación del aminoacil-ARNt al sitio A, bloqueando el primer paso de la fase de elongación (Pratt 1981; Chopra y Roberts, 2001).

FLO y OTC son antibióticos utilizados con frecuencia para el tratamiento de las principales patologías de origen bacteriano que afectan a peces en las piscifactorías españolas: vibriosis, yersiniosis o enfermedad de la boca roja, forunculosis, enfermedad de la columna o pasteurelisis, etc. (Blanco et al., 2004).

#### **3.3.1.2. Omeprazol**

El omeprazol (5-Methoxy-2-[[[4-methoxy-3,5-dimethyl-2-pyridinyl)methyl]sulfinyl]-1H-benzimidazole; OMP) es un fármaco perteneciente al grupo de los inhibidores de la bomba de protones (PPI) y se utiliza para el tratamiento de diversos trastornos gastrointestinales (Kosma et al., 2016). En el presente trabajo se ha seleccionado este fármaco como objeto de estudio debido a que fue el más consumido en España en 2015 según el informe anual del Sistema Nacional de Salud

(Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2015). Debido a su elevado consumo mundial y sus altas tasas de excreción en los cuerpos humanos, este compuesto podría tener un alto potencial para alcanzar el medio ambiente (Jain et al., 2007). Sin embargo, los niveles ambientales registrados de OMP son generalmente bajos en aguas (en el rango de  $\text{ng L}^{-1}$  y  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Rosal et al., 2010; Kosma et al., 2016). Las bajas concentraciones detectadas pueden deberse principalmente a su degradación o transformación, ya que se ha documentado la presencia de metabolitos urinarios humanos y productos de transformación formados por procesos abióticos cuando este compuesto llega al medio acuático (biodegradación, hidrólisis o fotodegradación) (DellaGreca et al., 2006 Besse et al., 2008; Ortiz de García et al., 2013; Boix et al., 2014; Kosma et al., 2017). Pero estos productos de transformación pueden ser más persistentes o tóxicos que el compuesto original (DellaGreca et al., 2003; Isidori et al., 2005; Diniz et al., 2015).

### **3.3.2. Productos de cuidado e higiene personal**

#### **3.3.2.1. Benzofenona-3**

La benzofenona-3 u oxibenzona (2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone; BP-3) es un filtro solar orgánico frecuentemente determinado en aguas de entrada y salida de las EDAR y, en menor concentración, en aguas superficiales e incluso en el agua corriente (Poiger et al., 2004; Negreira et al., 2009; Díaz-Cruz et al., 2012). El contenido máximo de este filtro solar permitido en los productos comerciales es un 10 % (Anexo VI Reglamento (CE) Nº 1223/2009). Los niveles ambientales encontrados varían significativamente en función del área geográfica y la estación del año. En temporada estival, las concentraciones determinadas son significativamente más elevadas en todos los tipos de aguas, dado el incremento que se produce en el uso de productos que incluyen estos compuestos, a la vez que aumenta la actividad turística, por lo que puede haber grandes cargas puntuales (Balmer et al., 2005). La BP-3 y, en general, este tipo de compuestos tienen un marcado carácter lipofílico, por lo que tienden a acumularse en matrices sólidas como sedimentos y bioacumularse en organismos

vivos. Se han detectado residuos de filtros solares en invertebrados, peces y hasta en aves (Fent et al., 2010).

#### 3.3.2.2. Triclosán

El triclosán (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol; TCS) es un antimicrobiano de amplio espectro con gran capacidad biocida contra multitud de bacterias, hongos y levaduras que se usa desde hace más de 40 años como conservante en gran variedad de productos. Si nos referimos a cifras de producción, este compuesto ha sido uno de los conservantes más importantes, elaborándose más de 1500 toneladas por año (Singer et al., 2002). Para el triclosán, la concentración máxima permitida en los productos cosméticos es de 0,3 % (Anexo V Reglamento (CE) Nº 1223/2009), aunque es una sustancia que está continuamente vigilada. Según el *Scientific Committee on Consumer Safety* de la Comisión Europea (SCCS 2011) esta concentración no se considera segura para el consumidor debido, sobre todo, a la magnitud de la exposición acumulativa derivada del uso de distintos productos de permanencia en piel como lociones hidratantes o aerosoles.

En cuanto a su estructura química, el triclosán es un derivado clorado del hidroxifenil éter con una baja volatilidad y solubilidad en agua. Posee elevada estabilidad térmica y un gran potencial como antimicrobiano, lo que lo convierte en un componente idóneo para su uso como antiséptico, desinfectante o conservante en entornos clínicos o en diversos campos del sector productivo como la industria cosmética, farmacéutica, para la fabricación de productos para la higiene del hogar, de plásticos, etc. (Dann and Hontela, 2011). La actividad antibacteriana de este compuesto se debe a la inhibición específica de la síntesis de ácidos grasos (Heath et al., 1999). A concentraciones subletales actúa mediante la inhibición de la actividad de la enoil-acil reductasa bacteriana (FabI), una enzima crítica en la síntesis de ácidos grasos (Heath et al. 2002, Zhang et al. 2004). A concentraciones bactericidas, se cree que actúa a través de múltiples mecanismos no específicos, incluyendo daños en la membrana celular (Gilbert y McBain, 2002).

Diversos estudios indican que el triclosán es sumamente tóxico para ciertos tipos de organismos acuáticos, especialmente para las microalgas (González-Pleiter et al., 2017). Además, tiene tendencia a bioacumularse en los tejidos grasos de humanos y otros animales (Orvos et al., 2002).

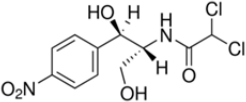
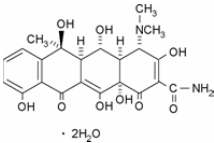
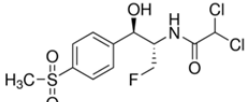
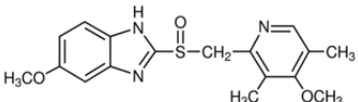
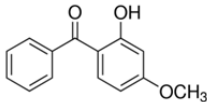
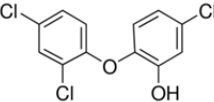
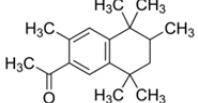
### 3.3.2.3. Tonalide

El tonalide (6-Acetyl-1,1,2,4,4,7-hexamethyltetralin; AHTN) es una fragancia sintética policíclica que sigue utilizándose y detectándose en aguas. De todas las fragancias presentes en el mercado, es una de las más importantes en volumen de producción (Clara et al., 2011). Es una sustancia lipofílica, con elevada estabilidad química, baja biodegradabilidad y un alto potencial de bioacumulación. A pesar de que se ha demostrado su potencial toxicidad, todavía son pocos los estudios sobre sus efectos en el medio ambiente. La UE (Directiva 2008/42/EC) ha establecido una concentración máxima autorizada para este compuesto en el cosmético acabado del 0,1 % para productos de permanencia (excepto productos hidroalcohólicos 1 %, fragancia fina 2,5 % y fragancia en crema 0,5 %) y del 0,2 % en productos de aclarado.

Los contaminantes emergentes seleccionados en esta tesis se resumen en la Tabla 2. Todos los compuestos utilizados son comercializados por Sigma-Aldrich y poseen una pureza superior al 98 %. Las soluciones *stock* de los contaminantes se preparan antes de cada ensayo disolviendo el compuesto puro en agua destilada o metanol, dependiendo de su solubilidad. En los casos en los que el contaminante se disuelve en metanol, también se realizan cultivos control con el solvente para evaluar si existen diferencias significativas en el crecimiento microalgal en comparación con los cultivos control sin solvente. Esta comparación no reveló ninguna diferencia significativa (*t* - Test; *p*-valor > 0,05), por lo que los restantes ensayos se realizaron usando sólo el control con el solvente.

En todos los casos, el volumen que se añade de contaminante nunca excede el 0,05 % del volumen final del cultivo.

Tabla 2. Contaminantes emergentes objeto de estudio.

Compuesto	Abreviatura	Nº CAS	PM	Estructura
Cloranfenicol	CLO	56-75-7	323,13	
Oxitetraciclina	OTC	6153-64-6	496,46	
Florfenicol	FLO	73231-34-2	358,21	
Omeprazol	OMP	73590-58-6	345,42	
Benzofenona-3	BP-3	131-57-7	228,24	
Triclosán	TCS	3380-34-5	289,54	
Tonalide	AHTN	21145-77-7	258,40	

### 3.4. Diseño experimental

Para evaluar los potenciales efectos tóxicos de los contaminantes emergentes sobre la microalga *T. suecica* se realizan bioensayos de inhibición del crecimiento de 96 h en los que las células son expuestas a concentraciones crecientes de cada compuesto, con el fin de determinar aquellas concentraciones que se utilizarán para realizar un estudio más detallado a nivel citómico. Además se realizan controles negativos, sin contaminante. Los cultivos se establecen a partir de un inóculo en fase de crecimiento exponencial y se preparan en tubos *Kimax* conteniendo 40 mL de

cultivo a una densidad inicial de  $5 \cdot 10^4$  células mL<sup>-1</sup>. Esta densidad fue seleccionada tras realizar estudios previos de crecimiento con distintas densidades celulares iniciales, con el fin de elegir aquel medio y aquella densidad que permitiesen ajustar el crecimiento microalgal a una curva sigmoidea que alcanzase la fase estacionaria a las 96 h. Los cultivos se mantienen sin aireación en las mismas condiciones de luz y temperatura descritas en el apartado anterior para los cultivos *stock*. En todos los ensayos se realizan tres réplicas de cada concentración y de los controles.

Una vez escogidas las concentraciones subletales que se utilizarán para cada contaminante, se realizan experiencias de 24 h en las mismas condiciones descritas; transcurrido este tiempo, se toman muestras para realizar los diferentes análisis. De este modo se completa un ciclo de 12:12 h luz:oscuridad. Se ha comprobado que, tras este corto período de tiempo, las microalgas experimentan ajustes metabólicos en respuesta a los contaminantes (Esperanza et al., 2015).

### **3.5. Análisis por citometría de flujo (CMF)**

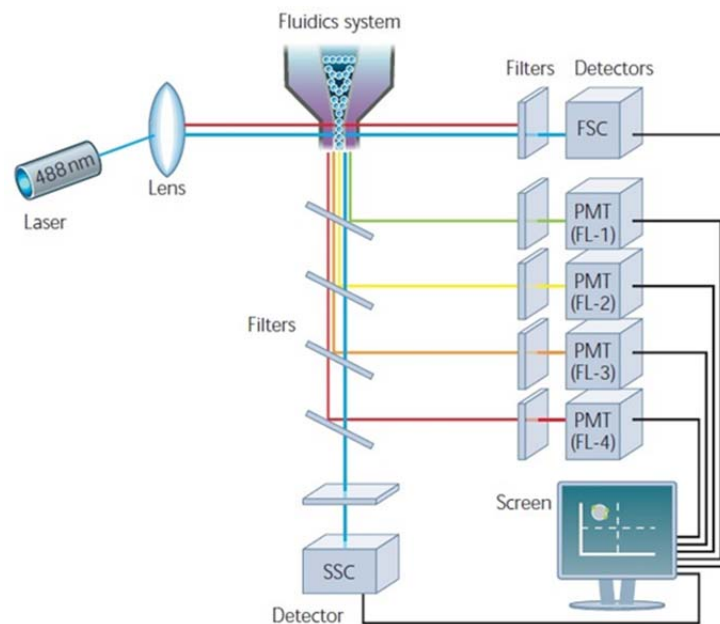
Uno de los objetivos prioritarios en el campo de la evaluación de la contaminación ambiental es el desarrollo de marcadores basados en la respuesta fisiológica de organismos vivos con el fin de agilizar la obtención de datos biológicos que permitan analizar el riesgo que conlleva la liberación al ambiente de compuestos potencialmente contaminantes. En este sentido, la CMF se presenta como un método alternativo a los parámetros utilizados en ensayos de toxicidad tradicionales, basados fundamentalmente en medidas a nivel poblacional y a un único tiempo final de ensayo, como la inhibición del crecimiento microalgal.

La CMF es una técnica que permite determinar un elevado número de propiedades y/o funciones de células individuales a gran velocidad, pudiendo utilizar una gran variedad de moléculas bioquímicamente específicas, no tóxicas y fluorescentes, en condiciones muy cercanas al estado *in vivo* en exposiciones no prolongadas a niveles de luz muy elevados (Carter y Meyer, 1990).



### 3. Material y métodos

En un citómetro de flujo el análisis se lleva a cabo haciendo pasar un flujo de partículas (bolas, células, protoplastos, núcleos, cloroplastos, etc.) en suspensión por el punto de enfoque de un haz de láser. La interacción de las partículas con el láser provoca, por un lado, la dispersión de parte de la luz del haz que se recoge por lentes situadas frontal y perpendicularmente respecto al mismo y, por otro lado, la emisión de fluorescencia debida a la excitación por el láser de fluorocromos naturales o incorporados a la célula que se recoge por la lente situada perpendicularmente al haz del láser (Shapiro, 1995) (Fig. 2).



**Figura 2.** Esquema de los componentes de un citómetro de flujo. (Imagen modificada de Rahman, 2014).

La cantidad de luz dispersada con un ángulo  $< 20^\circ$  respecto al haz del láser, que recibe el nombre de luz refractada en el ángulo anterior o *forward scatter light* (FS) es proporcional al tamaño de la célula. Esta dispersión es recogida por un detector de dispersión o fotodiodo. La luz del láser dispersada con un ángulo de  $90^\circ$  es recogida por una lente situada perpendicularmente al flujo de células y al haz de láser. A la cantidad de luz dispersada en un ángulo de  $90^\circ$  con respecto al eje

del haz del láser se le llama luz refractada en el ángulo lateral o *side scatter light* (SS) y, en el caso de las células, es proporcional a su complejidad o granularidad intracelular. Esta dispersión lateral es recogida gracias a un espejo dicroico de paso largo a 500 nm situado con un ángulo de 90º respecto al haz de luz. Este espejo dicroico separa la luz del láser dispersada lateralmente, reflejándola hacia su fotomultiplicador, permitiendo solo el paso de la luz fluorescente emitida por la partícula y cuya longitud de onda es superior a 500 nm. A continuación, las diferentes fluorescencias serán separadas y enviadas a su fotomultiplicador correspondiente en función de su longitud de onda, gracias a una combinación de espejos dicroicos y filtros (Fig. 2).

Cuando una célula individualizada pasa frente al haz de láser en un citómetro de flujo produce una señal en fotones con una intensidad determinada; esta señal es detectada por un fotosensor que convierte esta luz en una corriente eléctrica proporcional a la intensidad de la misma. A su vez, esta corriente es preamplificada a un pulso electrónico cuya amplitud es proporcional al número de fotones que originalmente alcanzaron el fotodetector, es decir, a la intensidad de la señal. Estos pulsos son individuales de cada célula y del parámetro biológico que se está determinando. Son proporcionales al ancho de la señal de luz, a la altura o al área integrada de la misma. La amplitud del pulso electrónico se convierte en un número canal. Estos números canales pueden ser procesados a través de amplificadores lineales o logarítmicos. En la amplificación lineal, el número canal es directamente proporcional a la intensidad de luz provocada por la interacción de la célula con el haz de láser (fluorescencia lineal; FL LIN). En una amplificación logarítmica, la señal electrónica de salida convertida en número canal es proporcional al logaritmo de la señal de luz de entrada (fluorescencia logarítmica; FL LOG). Estos canales se miden en unidades arbitrarias (u.a.). Esta unidad arbitraria se corresponde con el canal en el que aparece la media de la distribución de datos (histograma) en cada señal (Ormerod, 2008). Los resultados de los análisis

citométricos se presentan en forma de histogramas de distribución de la población celular con respecto a los parámetros analizados.

El citómetro utilizado es un Gallios (Beckman Coulter Inc.), equipado con un láser de argón como fuente de luz, que emite a 488 nm (luz azul). Este citómetro presenta detectores *forward* (FS) y *side* (SS) *scatter light* y 4 fotomultiplicadores o detectores de fluorescencia diferentes en función de la longitud de onda: FL1 (fluorescencia verde, 505-545 nm), FL2 (fluorescencia amarilla, 560-590 nm), FL3 (fluorescencia anaranjada, 605-635 nm) y FL4 (fluorescencia roja, 660-700 nm).

Para mantener las células en suspensión y en condiciones fisiológicas óptimas se utiliza una solución salina comercial (*IsoFlow*; Beckman Coulter Inc.). Para conseguir que en el punto de iluminación pasen las células de una en una, se estableció una velocidad de flujo baja (200-400 contajes por segundo) y para cada parámetro estudiado se analizaron como mínimo 10.000 células. Para los diferentes análisis, se prepararon suspensiones celulares en tubos de citometría de poliestireno (12 x 75 mm) a partir de alícuotas de cada tratamiento diluídas en tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) estéril (pH 7,2) para obtener una densidad final de  $5 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup>.

Los parámetros se analizan en modo logarítmico, si no se menciona lo contrario, calculándose la media (u.a.) para la o las poblaciones celulares identificadas en el citograma mediante el *software* del equipo. Los datos obtenidos son recogidos utilizando archivos *listmode*. El *software Kaluza Flow Cytometry Analysis V.1.1*. (Beckman Coulter Inc.) proporciona parámetros estadísticos y gráficas de las distribuciones de los valores obtenidos mediante esta técnica.

Los fluorocromos utilizados se preparan en dimetilsulfóxido (DMSO), en la mayoría de los casos a una concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Se conservan a -20 °C, protegidos de la luz y repartidos en tubos *ependorff* para evitar su degradación por ciclos de congelación-descongelación. La excepción la constituye el yoduro de propidio (IP), que se prepara en tampón PBS pH 7,4, esterilizado en autoclave a 120 °C durante 20 min, y que se conserva a 4 °C. Las concentraciones de

fluorocromos que se utilizaron en este estudio permiten la tinción del 100 % de las células microalgales analizadas en cada caso sin afectar a su viabilidad ni a su autofluorescencia basal.

### 3.5.1. Determinación de la densidad celular

La densidad celular de los cultivos se determina diariamente mediante recuento por CMF del número de células presentes en cada uno de los cultivos. Para ello, se utiliza una suspensión de concentración conocida de fluoroesferas, *Flow-Count Fluorospheres* (Beckman Coulter Inc.), que presentan un rango de emisión de fluorescencia entre 525 nm y 700 nm cuando se excitan a 488 nm.

Las tasas de crecimiento ( $\mu$ ) para cada tiempo y tratamiento ensayado, expresadas en día<sup>-1</sup>, se calculan mediante la siguiente fórmula:

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

donde ( $t_0$ ) y ( $t$ ) son el tiempo inicial y final del período estudiado, ambos expresados en días, y ( $N_t$ ) y ( $N_0$ ) el número de células mL<sup>-1</sup> en esos tiempos.

La concentración efectiva media (*Effective Concentration 50%*; EC<sub>50</sub>), es decir, la concentración de la sustancia ensayada que provoca una disminución del crecimiento del 50 % con respecto al control, se obtiene mediante interpolación gráfica en las curvas de concentración-respuesta usando el programa *CompuSyn* (Chou y Martin, 2005).

### 3.5.2. Propiedades inherentes celulares

Se analizan mediante CMF el tamaño o volumen celular, la complejidad intracelular y la autofluorescencia de las microalgas cultivadas con los diferentes contaminantes emergentes ensayados. Estos parámetros se estudian directamente a partir de las células en suspensión, sin añadir ningún fluorocromo.

#### Tamaño

Las medidas de dispersión frontal (luz del láser dispersada entre 1 y 20° respecto al haz) se recogen en el detector FS. Dicha medida se correlaciona

principalmente con el tamaño o volumen celular, aunque está influida por la estructura y composición intracelular (vesículas, ribosomas,...) (Mullaney et al., 1969).

#### **Complejidad intracelular**

La luz refractada en el ángulo lateral (luz refractada 90° respecto al haz) se recoge en el detector SS y se correlaciona con la estructura intracelular, como la relación núcleo-citoplasma, presencia de vesículas, etc., y permite estudiar la granularidad o complejidad celular (Shalzman et al., 1975).

#### **Fluorescencia de la clorofila *a***

Los microorganismos fotosintéticos unicelulares, como las microalgas, presentan generalmente una fluorescencia natural muy fuerte debido a la presencia de clorofila y sus derivados, o de otros pigmentos accesorios como los carotenoides (diatomeas y dinoflagelados) y las ficobiliproteínas (criptófitas y cianobacterias) (Cunningham, 1993).

La clorofila *a* se excita con luz a 488 nm y emite fluorescencia en el rango de 680-720 nm, por lo que esta autofluorescencia se recoge en el detector FL4. De este modo, podemos estudiar simultáneamente con la autofluorescencia microalgal otros parámetros biológicos con fluorocromos que en su mayoría emiten por debajo de los 600 nm de longitud de onda (Chisholm et al., 1988).

#### **3.5.3. Viabilidad celular**

El estudio de la viabilidad celular de las células expuestas a los contaminantes frente a las células de los cultivos control se lleva a cabo mediante una tinción vital con un fluorocromo ampliamente utilizado, el yoduro de propidio (IP). Este fluorocromo se intercala entre los pares de bases de los ácidos nucleicos de doble cadena, tanto ADN como ARN, emitiendo fluorescencia en el espectro del rojo (emisión máxima a 617 nm), cuando es excitado con luz azul (488 nm) (Carter, 1990). La membrana celular es impermeable al IP; es decir, este fluorocromo no es capaz de penetrar al interior celular en las células viables. Sin embargo, sí es capaz de penetrar en aquellas células que tienen alterada la integridad de su membrana plasmática, anclándose a los ácidos

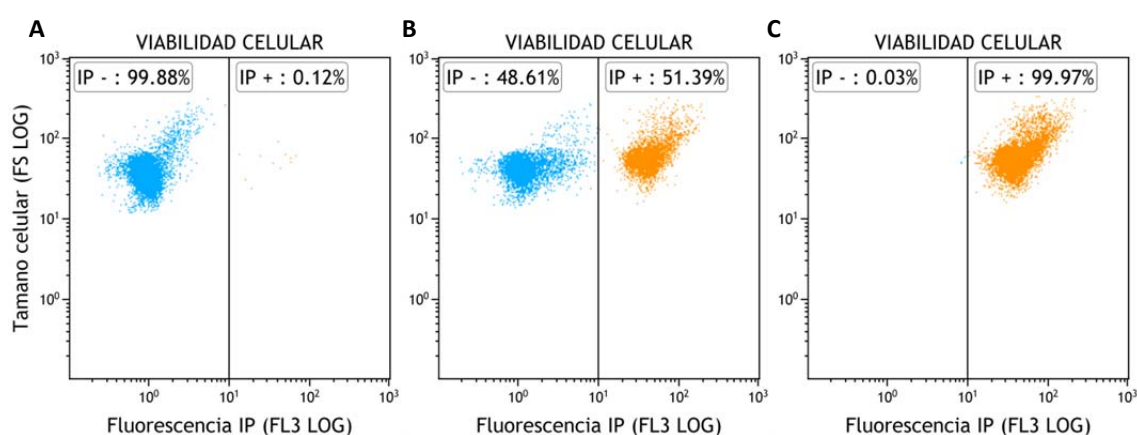
nucleicos. De este modo, el IP permite discriminar entre células viables no fluorescentes (IP-) y células no viables fluorescentes (IP+).

La fluorescencia del IP se recoge en el detector FL3 (605-635 nm) en escala logarítmica. Las suspensiones microalgales se incuban con una concentración final de IP de  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (4 mM) (a partir de una solución *stock* de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  en PBS) durante 10 min, en oscuridad y a temperatura ambiente (Prado et al., 2009a). Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de células viables (IP-) y células no viables (IP+).

#### Validación del método

Para validar el método se añade IP, en las condiciones descritas anteriormente, a distintas suspensiones celulares con porcentajes conocidos de células vivas y células muertas sometidas a choque térmico mediante microondas durante 10 s a 700 W. Se analizan en el citómetro y se observa si los porcentajes obtenidos de células viables y no viables se corresponden con los porcentajes teóricos de células vivas y muertas de la mezcla correspondiente.

Los porcentajes de células en cada región del citograma indican el porcentaje de cada tipo de célula, correspondiente a mezclas de 100/0 %, 50/50 %, 0/100 % de células vivas (IP-)/muertas (IP+) (Fig. 3).



**Figura 3.** Validación del método de análisis de viabilidad de células de *T. suecica* mediante CMF utilizando IP. Los citogramas muestran los porcentajes de células viables (IP-) y no viables (IP+) correspondientes a mezclas de células vivas/muertas: 100/0 % (A); 50/50 % (B) y 0/100 % (C).

#### 3.5.4. Actividad metabólica

Para el estudio de la actividad metabólica celular se realiza un análisis de la actividad esterasa inespecífica, que se basa en la generación de fluorescencia derivada de la hidrólisis enzimática del diacetato de fluoresceína, conocido como FDA (por sus siglas en inglés; *fluorescein diacetate*). El FDA es un éster no polar, lipofílico y no fluorescente que penetra libremente en las células. Una vez dentro, la molécula de FDA pierde los grupos acetato debido a la acción de esterasas citoplasmáticas no específicas que hidrolizan los enlaces éster en las células metabólicamente activas. La fluoresceína resultante es una molécula polar, hidrofílica y altamente fluorescente, que queda retenida en el interior celular siempre y cuando se trate de células viables que tengan intacta la membrana plasmática. La ausencia de fluorescencia verde de la fluoresceína indica efectos tóxicos sobre la membrana celular y/o la actividad de las esterasas, que son enzimas esenciales para el funcionamiento normal de la célula. De este modo, podremos distinguir entre células fluorescentes metabólicamente activas (FDA+) y células no fluorescentes metabólicamente no activas (FDA-). Las células fluorescentes metabólicamente activas son siempre viables. Sin embargo, las células no fluorescentes metabólicamente inactivas pueden ser viables (sin actividad esterasa) o no viables (con alteraciones en la membrana plasmática que impiden la retención de la fluoresceína en el interior celular) (Jochem, 2000).

Dado que la fluoresceína se acumula en el interior de las células activas, la actividad metabólica puede medirse analizando la intensidad de la señal fluorescente emitida, la cual es proporcional a la cantidad de fluorocromo acumulado y el tiempo transcurrido (Prado et al., 2009a). Comparando las diferencias entre la fluorescencia emitida por las células metabólicamente activas (FDA+), es posible detectar cambios en la actividad metabólica o vitalidad celular.

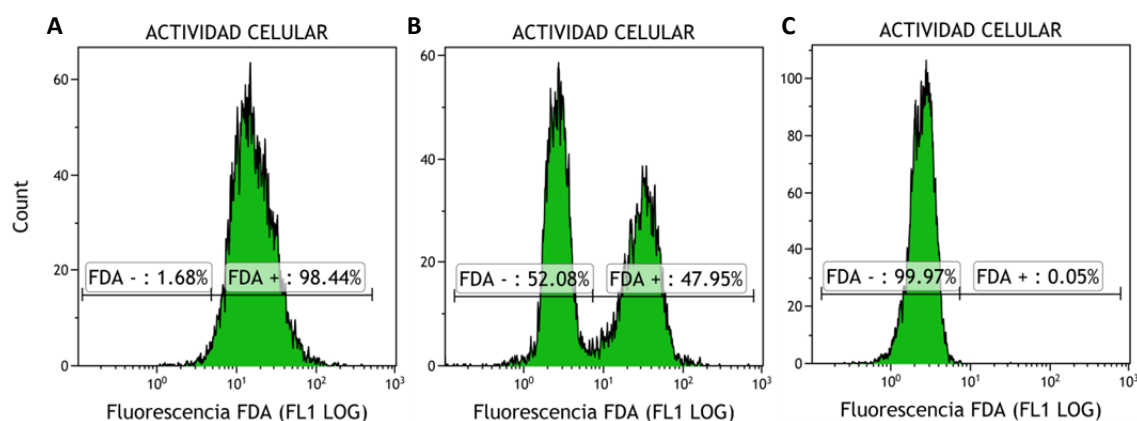
La fluorescencia verde de la fluoresceína se recoge en el detector FL1 (505-545 nm) en escala logarítmica. Las suspensiones microalgales se incuban con una concentración final de FDA de  $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  (0,48 mM) durante 15 min, en oscuridad y a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de

células activas (FDA+) y no activas (FDA-) y dentro de la población activa (FDA+), se analizan las variaciones en la actividad celular analizando los valores medios de fluorescencia.

#### Validación del método

Para validar el método se añade FDA, en las condiciones descritas anteriormente, a distintas suspensiones celulares con porcentajes conocidos de células vivas y células muertas sometidas a choque térmico mediante microondas durante 10 s a 700 W. Se analizan en el citómetro y se observa si los porcentajes obtenidos de células metabólicamente activas y no activas se corresponden con los porcentajes teóricos de células vivas y muertas de la mezcla correspondiente.

Los porcentajes de células en cada región del citograma indican el porcentaje de cada tipo de célula, correspondiente a mezclas de 100/0 %, 50/50 %, 0/100 % de células vivas (activas; FDA+)/muertas (no activas; FDA-) (Fig. 4).



**Figura 4.** Validación del método de análisis de actividad celular en *T. suecica* mediante CMF utilizando FDA. Los citogramas muestran los porcentajes de células activas (FDA+) y no activas (FDA-) correspondientes a mezclas de células vivas/muertas: 100/0 % (A); 50/50 % (B) y 0/100 % (C).

---

### 3.5.5. Estrés oxidativo

Todos los organismos aerobios producen durante sus procesos metabólicos las denominadas especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*; ROS). El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de oxígeno



reactivo y la capacidad del sistema biológico de destoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Este entorno reductor es preservado por las enzimas que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Desajustes en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan los componentes celulares, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN (Foyer y Noctor, 2005).

Las ROS tienen una vida media muy corta y están presentes a unas concentraciones celulares muy bajas, por ello la CMF es una técnica ideal para su estudio ya que es rápida y muy sensible (Tarpey y Fridovich, 2001).

Las ROS estudiadas son el ión superóxido ( $O_2^-$ ) utilizando el fluorocromo hidroetidina (HE, *Hydroethidine*) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) utilizando el indicador dihidrorrodamina 123 (DHR 123, *Dihydrorhodamine*).

#### **Nivel intracelular de ión superóxido**

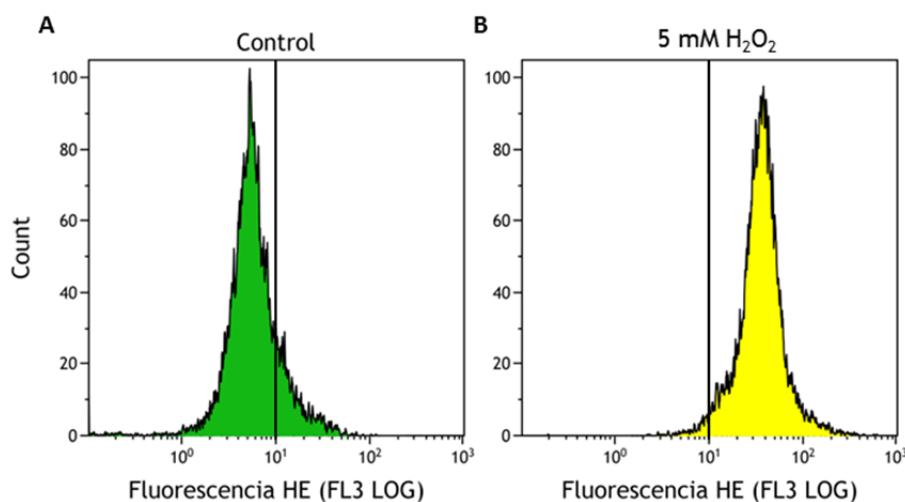
El HE difunde a través de las membranas celulares y sufre oxidación por iones superóxido formando etidio, que se intercala en el ADN y queda retenido en el interior celular (Benov et al., 1998). Cuando el etidio se excita a 488 nm, emite fluorescencia que es recogida en el detector FL3 (605-635 nm) en escala logarítmica, ya que tiene una emisión de fluorescencia máxima en torno a los 605 nm.

Las suspensiones microalgales se incuban con una concentración final de HE de  $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  durante 30 min, en oscuridad y a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos se expresan como la media de la fluorescencia (u.a.) recogida en el detector FL3 o, en el caso de detectar dos poblaciones microalgales, se expresa como el porcentaje de células HE+ (células con elevados niveles de ión  $O_2^-$ ).

#### Validación del método

Para validar el método se indujo un estrés oxidativo exógeno mediante la incubación de las células, previamente teñidas con HE en las condiciones descritas anteriormente, con un prooxidante conocido, el  $H_2O_2$ , a una concentración de

5 mM durante 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad. En las células expuestas al oxidante se observa un aumento de la fluorescencia, es decir, un aumento del nivel intracelular de ión superóxido (Fig. 5).



**Figura 5.** Validación del método de determinación de ión superóxido intracelular en *T. suecica* mediante CMF utilizando HE. Se representan los citogramas correspondientes a un cultivo control (A) y un cultivo expuesto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM (B).

---

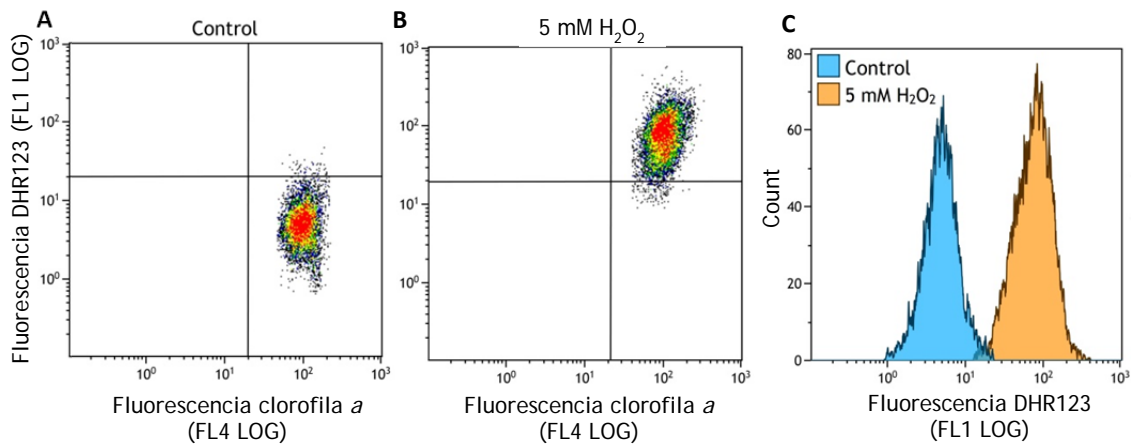
### Nivel intracelular de peróxido de hidrógeno

El DHR 123 atraviesa libremente la membrana citoplasmática y es oxidado en el interior celular, principalmente por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en una reacción lenta a menos que esté mediada por peroxidasas celulares y, secundariamente, por iones peroxinitrito. El producto de esta oxidación es la rodamina 123, una molécula fluorescente (emisión máxima a 529 nm), catiónica y lipofílica, que queda retenida en el interior celular, localizada en la mitocondria (Royall y Ischiropoulos, 1993). Hay estudios que demuestran la especificidad de la DHR123 por el peróxido de hidrógeno y que concluyen que la oxidación de este fluorocromo indica sólo la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y peroxidasas intracelulares, pero no la generación de iones superóxido (Henderson y Chappell, 1993).

La fluorescencia del DHR 123 se analiza en el detector FL1 (505-545 nm) en escala logarítmica. Las suspensiones microalgales se incuban con una concentración final de DHR 123 de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  durante 40 min, en oscuridad y a temperatura ambiente (Prado et al., 2012). Los resultados obtenidos se expresan como la media de la fluorescencia (u.a.) recogida en el detector FL1.

#### Validación del método

Para validar el método se indujo un estrés oxidativo exógeno mediante la incubación de las células, previamente teñidas con DHR 123 en las condiciones descritas anteriormente, con un prooxidante conocido, el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a una concentración de 5 mM durante 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad. En las células expuestas al oxidante se observa un aumento de la fluorescencia, es decir, un aumento del nivel intracelular de peróxido de hidrógeno (Fig. 6).



**Figura 6.** Validación del método de determinación de peróxido de hidrógeno intracelular en *T. suecica* mediante CMF utilizando DHR 123. Se representan los citogramas biparamétricos correspondientes a un cultivo control (A), a un cultivo expuesto a  $\text{H}_2\text{O}_2$  5mM (B) y los citogramas de la fluorescencia del DHR 123 de ambos cultivos superpuestos (C).

#### 3.5.6. Potencial de membrana citoplasmática

Se considera que el mantenimiento de un potencial transmembrana negativo es un mecanismo de control que permite que las células permanezcan

en un estado inactivo, de modo que se ha sugerido que cualquier cambio en este potencial de membrana citoplasmático, por ejemplo como consecuencia de la unión de ciertos ligandos a receptores transmembrana, puede ser mediador de la consiguiente respuesta fisiológica celular.

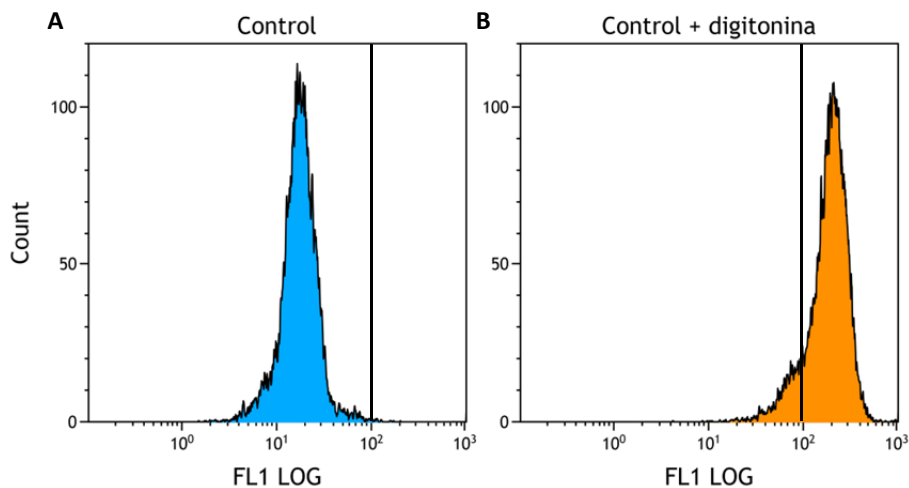
El fluorocromo utilizado en este trabajo bis-(1,3-ácido dibutilbarbiturico) trimetino oxonol (*bis-(1,3-dibutylbarbituric acid trimethine oxonol*; DiBAC<sub>4</sub>(3)), pertenece a la familia de los fluorocromos derivados del oxonol. Al ser una molécula lipofílica cargada sirve como indicador del potencial de membrana ya que se espera que el reparto entre el interior celular y el medio cumpla la ecuación de Nernst (Rabinovitch y June, 1990). El DiBAC<sub>4</sub>(3) es un indicador de respuesta lenta aniónico, que penetra en la célula con mayor facilidad a través de membranas celulares relativamente despolarizadas, donde es retenido por unión a lípidos y proteínas intracelulares. Por lo tanto, su concentración celular aumenta a medida que el potencial de membrana baja hacia cero y disminuye si la célula se hiperpolariza, es decir, si el citosol se vuelve más electronegativo con respecto al medio. Además, la carga negativa del fluorocromo provoca su exclusión de la mitocondria, cuyo potencial de membrana es altamente negativo, lo que reduce este componente de la fluorescencia total y simplifica la medida del potencial de membrana en eucariotas (Klapperstück et al., 2009).

La fluorescencia del DiBAC<sub>4</sub>(3) se analiza en el detector FL1 (505-545 nm) en escala logarítmica. Las suspensiones microalgales se incuban con una concentración final de DiBAC<sub>4</sub>(3) de 0,5 µg mL<sup>-1</sup> durante 10 min, en oscuridad y a temperatura ambiente (Prado et al., 2012). Los cambios en la partición del indicador son detectados por cambios en la intensidad de fluorescencia de las células que toman o liberan la molécula según su potencial de membrana, por lo que los resultados obtenidos se expresan como la media de la fluorescencia (u.a.) recogida en el detector FL1.

#### Validación del método

Para validar el método, se induce una despolarización de las células permeabilizando sus membranas con digitonina. La digitonina es un detergente que solubiliza lípidos en agua, por lo que se utiliza para permeabilizar membranas celulares. Este compuesto permeabiliza selectivamente las membranas plasmática y nuclear frente a orgánulos como la mitocondria debido a diferencias en la composición en colesterol de las membranas de estos orgánulos (Rabinovitch y June, 1990).

Las células se resuspenden en tampón PBS y se incuban con digitonina a una concentración final de  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  (a partir de una solución *stock* de  $4 \text{mg mL}^{-1}$  en DMSO) durante 30 min, en oscuridad y a temperatura ambiente. Dichas células se tiñen con DiBAC<sub>4</sub>(3) bajo las condiciones descritas anteriormente. La despolarización provocada por la permeabilización de la membrana con digitonina provoca un aumento en la fluorescencia del fluorocromo (Fig. 7).



**Figura 7.** Validación del método de determinación del potencial de membrana citoplasmático en *T. suecica* mediante CMF utilizando DiBAC<sub>4</sub>(3). Se representan los citogramas correspondientes a un cultivo control sin digitonina (**A**) y a un cultivo incubado con digitonina (**B**).

### 3.5.7. Potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial se analiza utilizando el catión lipofílico yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarbocyanine iodide; JC-1), un fluorocromo que es internalizado y concentrado por la mitocondria y cuyo espectro de emisión fluorescente cambia reversiblemente de verde (525 nm) a amarillo/naranja (590 nm) en función del potencial de membrana mitocondrial (Cossarizza y Salvioli, 2001).

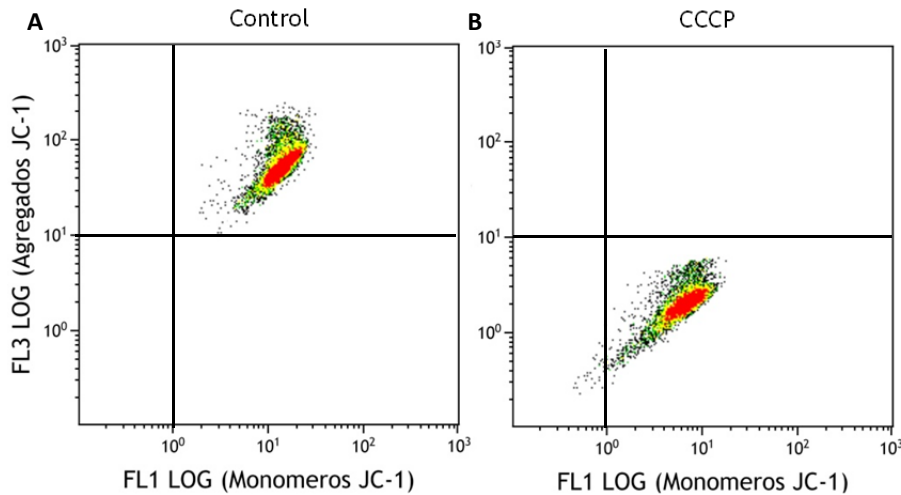
Tanto en el citoplasma como en la mitocondria, cuando el potencial de membrana es bajo, este fluorocromo se presenta en su forma monomérica, que al ser excitada con luz azul (488 nm), emite fluorescencia con un máximo a 525 nm (verde). En el interior de la matriz mitocondrial, cuando el potencial de membrana es muy negativo, es decir, cuando la membrana interna de este orgánulo se hiperpolariza, el JC-1 forma agregados que emiten fluorescencia a 590 nm (naranja) (Shapiro, 1995; Qu et al., 2001).

La fluorescencia del JC-1 se analiza en los detectores FL1 (505-545 nm) y FL3 (605-635 nm). Las suspensiones microalgales se incuban con una concentración final de JC-1 de 0,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  durante 15 min, en oscuridad y a temperatura ambiente (Prado et al., 2012). Los resultados se expresan como la relación entre la fluorescencia de la forma agregada y la fluorescencia de la forma monomérica (relación FL3/FL1), de modo que el potencial así estimado es independiente del tamaño de la célula y la concentración intracelular de JC-1.

#### Validación del método

Como control positivo para validar el método, las células se incuban con 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de carbonilcianida m-clorofenilhidrazona (*carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone*; CCCP) (a partir de una solución *stock* de 1  $\text{mg mL}^{-1}$  en DMSO) durante 15 min a temperatura ambiente y luego se tiñen con el fluorocromo JC-1 en las condiciones descritas anteriormente. El CCCP es un ionóforo de  $\text{H}^+$  que desacopla la fosforilación oxidativa, por lo tanto, elimina el gradiente electroquímico mitocondrial,

reduciendo la entrada de JC-1 y la aparición de la forma agregada del fluorocromo en las mitocondrias (Fig. 8).



**Figura 8.** Validación del método de determinación del potencial de membrana mitocondrial en *T. suecica* mediante CMF utilizando JC-1. En los citogramas biparamétricos se representa la fluorescencia emitida por la forma monomérica del fluorocromo (FL1) frente a la fluorescencia emitida por la forma agregada del mismo (FL3), para células control **(A)** y células incubadas con CCCP **(B)**.

#### 3.5.8. pH intracelular

Entre los parámetros que controlan las actividades metabólicas en las células, el pH intracelular (pH<sub>i</sub>) juega un papel muy importante. Es un parámetro que influye en funciones celulares como la regulación de las actividades enzimáticas y las cinéticas de transporte de nutrientes y metabolitos (Corvini et al., 2000).

Dado que varias reacciones metabólicas y el funcionamiento de los orgánulos celulares se ven afectados por cambios en la concentración intracelular de H<sup>+</sup>, es importante medir el pH<sub>i</sub> en condiciones fisiológicas. En este sentido, la utilización de un indicador fluorescente simplifica y agiliza notablemente el análisis (Musgrove et al., 1986).

En este estudio se utiliza la forma éster del indicador pH-dependiente 2',7'-bis(2-carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceína, el 2',7'-bis(2-carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceína acetoximetil éster (2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-

*carboxyfluorescein acetoxymethyl ester*; BCECF AM) (Ozkan y Mutharasan, 2002). El BCECF AM es una molécula no fluorescente que, al no poseer carga, atraviesa libremente las membranas celulares. Una vez dentro de la célula, esterasas intracelulares no específicas rompen el enlace éster y liberan la molécula BCECF, que posee fluorescencia pH-dependiente y carga negativa, por lo que queda retenida en el interior de las células viables.

El  $pK_a$  del BCECF es 6,98, valor cercano al pH fisiológico, una de las condiciones necesarias para la idoneidad de un fluorocromo sensible al pH, pues la respuesta máxima ocurrirá para valores de pH cercanos al  $pK_a$  (Musgrove et al., 1986).

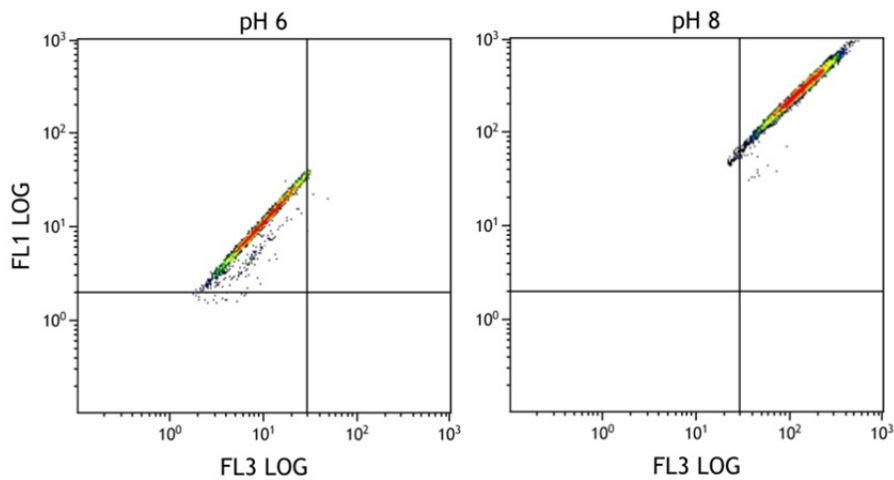
Cuando se excita con luz azul, este fluorocromo emite fluorescencia con un máximo a 525 nm (verde) y, en el rango de pH fisiológico, la intensidad de emisión aumenta al aumentar el pH. Además, emite con desvío en otra longitud de onda (620 nm) (Franck et al., 1996). Aunque el espectro de emisión de BCECF es mucho menos dependiente del pH que el espectro de excitación, se suele usar la relación de emisión de fluorescencia 525/620 nm (excitadas a 488 nm) para las mediciones de pH por CMF. Esto permite el desarrollo de un método radiométrico donde el cálculo de la relación entre los valores de fluorescencia obtenidos a estas dos longitudes de onda permite corregir diferencias en la carga del fluorocromo y/o el tamaño entre células (Franck et al., 1996).

La fluorescencia del BCECF se analiza, por lo tanto, en los detectores FL1 (505-545 nm) y FL3 (605-635 nm). La relación entre estas fluorescencias, se utiliza para calcular el  $pH_i$  independientemente de la variabilidad en la concentración intracelular de fluorocromo. Se ha demostrado que, en células teñidas con este fluorocromo, existe una relación lineal entre los valores de  $pH_i$  y el ratio FL1/FL3 (Pérez-Sala et al., 1995). Las suspensiones microalgales se incuban con una concentración final de BCECF AM de  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  durante 40 min, en oscuridad y a temperatura ambiente (Prado et al., 2012).



#### Validación del método

Para validar el método, las células teñidas con el indicador BCECF AM en las condiciones descritas anteriormente, se resuspenden en soluciones tampón fosfato con elevada concentración de iones  $K^+$ , preparadas a dos valores de pH (6 y 8) mezclando volúmenes adecuados de una solución de  $KH_2PO_4$  1 M y una solución de  $K_2HPO_4$  1 M. A estas suspensiones celulares se les añade el ionóforo nigericina a una concentración final de 20  $\mu M$  a partir de una solución *stock* 1 mM en etanol al 10 % (v:v) con el fin de igualar el  $pH_i$  con el pH del medio exterior. La nigericina es un ionóforo carboxílico  $H^+-K^+$  que elimina el gradiente de pH entre el exterior y el interior celular, mediante el equilibrio  $[K_i^+]/[K_e^+]=[H_i^+]/[H_e^+]$  (Corvini et al., 2000). Tras su análisis por CMF se observa un incremento de la fluorescencia en las células teñidas con BCECF AM a medida que aumenta el pH (Fig. 9).



**Figura 9.** Validación del método de análisis del  $pH_i$  en *T. suecica* mediante CMF utilizando BCECF AM. En los citogramas biparamétricos se representa la fluorescencia del fluorocromo recogida en los detectores FL1 y FL3 para un cultivo en solución tampón fosfato pH 6 **(A)** y un cultivo en solución tampón fosfato pH 8 **(B)**.

### 3.6. Determinación espectrofotométrica de clorofila *a*

Para el análisis espectrofotométrico de la clorofila *a* de *T. suecica* las células se recogen por centrifugación de un volumen determinado de cultivo en una centrífuga refrigerada ALC PK121R a 8000 g durante 20 min a 4 °C. Se retira el sobrenadante y la biomasa se resuspende en un volumen conocido de acetona al 90 % (v:v) para extraer los pigmentos, manteniéndola de este modo durante 24 h a 4 °C y en oscuridad para que la extracción sea completa. Una vez completada la extracción, se centrifuga de nuevo para retirar los restos celulares, y se recoge el sobrenadante, que contiene los pigmentos extraídos de las células. Con este sobrenadante se realizan lecturas de absorbancia a 664 y 647 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700, frente a un blanco de acetona al 90 %. Para el cálculo de la concentración de clorofila *a* se utilizó la siguiente ecuación (Jeffrey y Humphrey, 1975):

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

donde la clorofila *a* representa la concentración de dicho pigmento en  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de extracto, y  $A_{664}$  y  $A_{647}$  representan las absorbancias medidas a 664 y 647 nm, respectivamente.

### 3.7. Análisis estadístico

Para los análisis se calcularon las medias y las desviaciones estándar para cada tratamiento y para las tres réplicas.

El análisis estadístico de los datos se realiza mediante el programa estadístico *IBM SPSS Statistic* versión 21.0.0. Para cada experiencia, la hipótesis de que la concentración del contaminante emergente ensayado no afecta al parámetro de estudio, se analiza estadísticamente mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Cuando la hipótesis se rechaza, se utilizan pruebas de comparaciones múltiples *post hoc* como el test de Tukey o el test de Dunnett para determinar las diferencias entre cada tratamiento y con respecto al control. Se aplica en todos los casos un nivel de significación de 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

## **4. RESULTADOS**

---



#### 4.1. Capítulo I: Toxicidad ejercida por tres antibióticos utilizados en acuicultura en la microalga marina *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch.

La acuicultura es considerada una de las actividades económicas de mayor desarrollo, complementando la pesca extractiva y ayudando a conservar los recursos marinos. Sin embargo, como resultado de las actividades en las plantas de cultivo, se generan efluentes que contienen una mezcla compleja de sustancias potencialmente peligrosas, que finalmente alcanzan los ecosistemas marinos. En particular, los antibióticos son utilizados en acuicultura como herramienta profiláctica y terapéutica para prevenir y erradicar las infecciones provocadas por bacterias patógenas en los diferentes cultivos. La presencia de estos fármacos en los ecosistemas marinos puede provocar efectos deletéreos en organismos no diana como las microalgas.

En este capítulo se aborda el estudio del potencial efecto tóxico sobre la microalga marina *T. suecica* de tres antibióticos ampliamente utilizados en acuicultura y cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis proteica bacteriana, como son el cloranfenicol (CLO), el florfenicol (FLO) y la oxitetraciclina (OTC). Las células se expusieron a concentraciones crecientes de cada antibiótico (2,5, 5, 7,5 y 10 mg L<sup>-1</sup>) y se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento, calculando los valores de EC<sub>50</sub> tras 96 h de exposición a los fármacos. Con el fin de detectar potenciales alteraciones celulares a corto plazo, se analizaron el contenido en clorofila *a* y el tamaño, autofluorescencia, actividad y viabilidad celular tras sólo 24 h de exposición.

La presencia de los antibióticos en el medio provocó un descenso significativo de la tasa de crecimiento microalgal, obteniendo unos valores de EC<sub>50</sub> a las 96 h de exposición de 11,16, 9,03 y 17,25 mg L<sup>-1</sup> para CLO, FLO y OTC, respectivamente. Sin embargo, ninguno de los tres antibióticos afectó la integridad de la membrana plasmática, manteniéndose las células viables durante toda la duración del ensayo. En el caso de la OTC, se detectó una estimulación del crecimiento u hormesis, fenómeno común asociado a la acción de los antibióticos, a la concentración más baja utilizada (2,5 mg L<sup>-1</sup>), la cual podría activar factores de crecimiento y mecanismos antioxidantes y de reparación celulares. Por otro lado, al tratarse de cultivos no axénicos, la

inhibición del crecimiento observada puede verse exacerbada por la ausencia de ciertos factores de crecimiento o vitaminas producidas por la comunidad bacteriana asociada, la cual estaría afectada por la presencia de estos compuestos en el medio.

A pesar de no verse afectado significativamente el crecimiento ni la viabilidad celular a las 24 h de exposición, se detectaron cambios significativos en el resto de parámetros estudiados. Por lo general, el crecimiento es un parámetro menos sensible debido a que refleja un valor medio de la población, sin tener en cuenta la respuesta que se produce a nivel celular. Las células expuestas a los tres antibióticos mostraron el mismo patrón de respuesta citotóxica, observándose una disminución significativa del tamaño o volumen celular, de la actividad metabólica y del contenido en clorofila  $\alpha$  y un aumento significativo de la autofluorescencia celular medida por CMF.

Los fármacos están diseñados para optimizar el paso de los mismos a través de las membranas biológicas ejerciendo su función en diversos sistemas celulares, incrementándose de este modo las probabilidades de que produzcan sus efectos en organismos que no son su diana. En este estudio, la toxicidad aguda ejercida por los tres antibióticos se asocia al origen endosimbiótico de mitocondrias y cloroplastos, lo que los convierte en potenciales dianas de estos fármacos, alterando el estado fisiológico celular y disminuyendo la actividad metabólica y fotosintética, sin alterar la integridad de la membrana o viabilidad, como se refleja en los resultados obtenidos. Este hecho provocaría, por un lado, la inhibición de la síntesis de proteínas mitocondriales, especialmente las relacionadas con el transporte electrónico, esenciales para el correcto metabolismo y proceso de respiración celular y, por otro lado, la inhibición de la síntesis de proteínas en el cloroplasto. Debido a las similitudes existentes entre el ARN ribosomal de bacterias y cloroplastos, los ribosomas de los cloroplastos son sensibles a muchos antibióticos. Dado que las proteínas del aparato fotosintético son sintetizadas en los cloroplastos, daños en sus ribosomas podrían afectar la síntesis de clorofila y el rendimiento fotosintético, como se refleja en el descenso en el contenido celular de este pigmento y el aumento de fluorescencia observado.

El descenso en el tamaño celular detectado puede relacionarse con la inhibición del crecimiento y el descenso en contenido en pigmentos. Las células activas, antes de dividirse, aumentan su tamaño debido al incremento en orgánulos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y otras moléculas. Sin embargo, las células expuestas a antibióticos no experimentaron este aumento de volumen. A pesar del descenso del tamaño celular y del contenido en pigmentos, se observa un aumento de la fluorescencia de la clorofila *a*, lo que se traduce en una disminución de la eficiencia fotosintética que podría explicarse por un bloqueo de la cadena de transporte electrónico a nivel del PSII, debido a la inactivación de algunos centros de reacción.

Como conclusión, a pesar de que los antibióticos son sustancias con toxicidad selectiva y están diseñados para ser nocivos para las bacterias y no para otras formas de vida, se ha demostrado que las microalgas son particularmente sensibles a estos fármacos, siendo en este caso los parámetros más afectados aquellos relacionados con la fotosíntesis. Esta toxicidad se debe al origen que tienen los cloroplastos en cianobacterias, lo que los hace susceptibles al efecto de los antibióticos. La presencia de estos compuestos en el medio marino, afectaría negativamente la tasa fotosintética, repercutiendo en el correcto funcionamiento de los ecosistemas marinos. Por todo ello, el uso de estos antibióticos debería ser monitorizado cuidadosamente para reducir el riesgo toxicológico sobre los organismos de las aguas naturales receptoras.

A continuación, se adjunta la correspondiente publicación.

Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2014. Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. *Marine Environmental Research* 101, 1-7.

doi: 10.1016/j.marenvres.2014.07.011







Contents lists available at ScienceDirect

## Marine Environmental Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/marenvrev](http://www.elsevier.com/locate/marenvrev)

## Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch



Marta Seoane, Carmen Rioboo, Concepción Herrero, Ángeles Cid\*

Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña, Campus de A Zapateira s/n, 15071 A Coruña, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 May 2014  
 Received in revised form  
 24 July 2014  
 Accepted 29 July 2014  
 Available online 7 August 2014

## Keywords:

Antibiotics  
 Cell activity  
 Cell viability  
 Growth inhibition  
 Microalga  
 Photosynthesis  
 Toxicity

## ABSTRACT

Aquaculture facilities are a potential source of antibiotics to the aquatic ecosystems. The presence of these compounds in the environment may have deleterious effects on non-target aquatic organisms such as microalgae, which are often used as biological indicators of pollution. Therefore, the toxicity induced by chloramphenicol (CHL), florphenicol (FLO) and oxytetracycline (OTC), three antibiotics widely used in aquaculture, on the marine microalga *Tetraselmis suecica* was evaluated. Growth inhibition and physiological and biochemical parameters were analysed. All three antibiotics inhibited growth of *T. suecica* with 96 h IC<sub>50</sub> values of 11.16, 9.03 and 17.25 mg L<sup>-1</sup> for CHL, FLO and OTC, respectively. After 24 h of exposure no effects on growth were observed and cell viability was also unaffected, whereas a decrease in esterase activity, related with cell vitality, was observed at the higher concentrations assayed. Photosynthesis related parameters such as chlorophyll *a* cellular content and autofluorescence were also altered after 24 h of antibiotics addition. It can be concluded that *T. suecica* was sensitive to the three antibiotics tested.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The anthropogenic activity is a constant threat to the stability of aquatic ecosystems, since they are a sink for many chemicals that can have a direct effect on the aquatic organisms.

Aquaculture is a growing industry in response to the dramatic global population growth and the increasing demand for food. As a result of the activities in the aquaculture facilities, effluents containing a complex mixture of chemical compounds as disinfectants, antifouling substances, anaesthetics or antibiotics are generated and these compounds may reach aquatic ecosystems.

Infectious diseases are the main cause of the economic losses in aquaculture and have become a limiting factor for its development (Blanco et al., 2004). Therefore, the use of antibiotics has been essential to prevent the spread of pathogenic bacteria. Antibacterial agents are used as prophylactic and therapeutic tools to prevent or combat pathogens and their overuse may cause several adverse effects for the human and animal health and for the environment (Cabello, 2006). Medicated feeds are the main route of drug administration in fish because of their low cost and their easy use, but a considerable portion of the administered food may be not

eaten or absorbed by fish (Burka et al., 1997). In mollusc hatcheries, antibiotics are usually applied directly into the water. In both cases, these substances, eventually reach the environment and this may result in adverse ecological effects (Carballeira et al., 2012). In addition, antibiotics are molecules commonly used in both human and veterinary medicine and, in the last years, they have been considered emerging environmental micropollutants (Aminov, 2010; Kümmerer, 2009).

Although recorded environmental levels of antibiotics are usually low in waters (at ng L<sup>-1</sup> to µg L<sup>-1</sup>) (Gulkowska et al., 2007; Isidori et al., 2005; Xu et al., 2007) these drugs are considered "pseudopersistent" contaminants due to their continued release into the environment and their permanent presence (Hernando et al., 2006). The presence of antibiotics in the environment may also have deleterious effects on non-target aquatic organisms such as microalgae. In certain studies, using aquatic organisms of different trophic levels, it has been found that the toxicity of antibiotics is, in general, higher to cyanobacteria, probably due to their prokaryotic nature, than to unicellular eukaryotic primary producers as microalgae (González-Pleiter et al., 2013; Halling-Sørensen, 2000). Among eukaryotic organisms, multicellular species are in general less sensitive than unicellular microorganisms (Ferreira et al., 2007; Migliore et al., 1997; Wollenberger et al., 2000). Microalgae play a very important role in the aquatic ecosystems because they are the primary producers and any effect on

\* Corresponding author. Tel.: +34 981 167 000.  
 E-mail addresses: [angeles.cid@udc.es](mailto:angeles.cid@udc.es), [cid@udc.es](mailto:cid@udc.es) (Á. Cid).

them could affect higher trophic levels (Campanella et al., 2001; Rioboo et al., 2007). Microalgae have been recommended as test organisms because of their ecological relevance, sensitivity and because they are easily cultivated in the laboratory. For these reasons, these organisms are commonly used as biological indicators of pollution in ecotoxicological studies (McCormick and Cairns, 1994; Prado et al., 2009b).

The response of microalgae to a toxic substance is typically measured using population-based parameters, such as specific growth rate, biomass, pigment content or chlorophyll *a* fluorescence (Couderechet and Vernet, 2003; De Lorenzo and Fleming, 2008; Geoffroy et al., 2007; Nestler et al., 2012). The development of markers based on the physiological response of living organisms can accelerate the delivery of biological data and analyse the risk associated with environmental release of potentially polluting compounds. In this regard, several studies have shown that flow cytometry (FCM) is an effective tool in toxicological research (Cid et al., 1996a; Franklin et al., 2001; Franqueira et al., 1999; Prado et al., 2012a, 2012b; Rioboo et al., 2002). FCM is an alternative to the standard algal population based endpoints, since it allows a rapid and quantitative measurement of individual algal cells responses to toxic stress. Using this technique, simultaneous measurements of multiple cellular parameters are made separately on each cell within the suspension, near *in vivo* conditions, and not just as average values for the whole population (Prado et al., 2009a).

The aim of the present study was to evaluate the potential toxic effect of three antibiotics, chloramphenicol (CHL), florphenicol (FLO) and oxytetracycline (OTC), on the marine microalga *Tetraselmis suecica*. This species has a wide distribution along the Galician coast and is frequently used in aquaculture as food in the early larval stages of mollusks, fish and crustaceans (Fábregas et al., 2001). The antibiotics used in this study were selected also based on their use in aquaculture. All of them are broad-spectrum antibiotics widely used in aquacultural practice as antimicrobial agents to control diseases. CHL has been commonly used in hatcheries to control microbial growth in larval cultures (Uriarte et al., 2001). OTC and FLO antibiotics are frequently used for the treatment of the major bacterial pathologies affecting Spanish fish farming like vibriosis, redmouth disease, furunculosis or pasteurellosis (Blanco et al., 2004). Their mechanism of action is related with the inhibition of protein synthesis. CHL and FLO are antibiotics that bind to the 50S subunit of bacterial ribosomes, preventing the transfer of amino acids to extending peptide chains and subsequent protein formation (Marconi et al., 1990). OTC belongs to the tetracycline antibacterial group. This antibiotic binds to the 30S ribosomal subunit and blocks the A site, preventing the binding of amino-acyl tRNAs, thus blocking the first step of the elongation phase (Chopra and Roberts, 2001).

We hypothesize that the presence of these antibiotics may cause alterations on non-target organisms and could have harmful effects on the environment. To demonstrate this, microalgal cells were exposed to different concentrations of each drug. Growth inhibition, a classical parameter in ecotoxicological studies, was determined during 96 h. Other physiological and biochemical parameters were analysed after 24 h to detect early alterations in the microalgal cell physiology. These parameters were relative cell size changes, cell viability and activity and chlorophyll *a* auto-fluorescence and cellular content.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microalgal cultures

The marine microalgal species used in the present work, *T. suecica* (Kylin) Butch (*Prasinophyceae*), was obtained from the

Culture Centre of Algae and Protozoa (Cambridge, U. K.) and was isolated from Dr. Fábregas, University of Santiago (Fábregas, 1982).

*T. suecica* was maintained in filtered (pore size: 5 µm) and autoclaved (121 °C, 20 min) seawater enriched with Algal-1 medium (Herrero et al., 1991), at 18 ± 1 °C, illuminated with 68.25 µmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> with a dark:light cycle of 12:12 h and continuous aeration with filtered atmospheric air (Millipore Millex FG filters of 0.20 µm).

Batch cultures were carried out to evaluate the potential toxic effects of antibiotics on the microalga *T. suecica*. Toxicity tests were conducted in Kimax glass tubes containing 45 mL of culture. The medium and culture conditions were the same as the used for maintaining the algae. Cells from a 3-day-old culture, growing in a logarithmic phase, were used as inoculum for all experiments. Initial cell density for each experiment was 5 × 10<sup>4</sup> cells mL<sup>-1</sup>. All cultures were carried out in triplicate, being antibiotics tested in three independent experiments and each one was carried out with three biological replicates. Since a change in the pH of the culture could modify the toxicity of the antibiotics or alter the growth of the microalga, it was ensured that pH did not change significantly by daily measurements. Registered pH values were between 8.4 and 8.6.

### 2.2. Chemicals

The antibiotics were purchased from Sigma Aldrich. The purity of each antibiotic was higher than 95%. Stock solutions were made in distilled and sterilized water and then were filtered (pore size: 0.20 µm). These solutions were freshly prepared before each experiment. Four concentrations were tested for each test substance (2.5, 5.0, 7.5 and 10 mg L<sup>-1</sup>). This range covers the concentrations used in aquaculture for the three antibiotics. In addition to these, cultures without antibiotic were also included as a control.

### 2.3. Flow cytometric determinations

FCM analysis of *T. suecica* cells was performed in a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter Inc.) equipped with an argon-ion excitation laser (488 nm), detectors of forward (FS) and side (SS) light scatter and four fluorescence detectors corresponding to four different wavelength intervals: 505–550 nm (FL1), 550–600 nm (FL2), 600–645 nm (FL3) and >645 nm (FL4). To exclude non-algal particles, chlorophyll-*a* fluorescence was used, and red fluorescence histograms (>645 nm) were used as a gate.

#### 2.3.1. Cell density

Cellular density was determined every 24 h during the 96 h of the test for each treatment and for the controls. Each of the three biological replicates was sampled once. Growth of microalgal cultures was measured by counting daily culture aliquots in the flow cytometer using a suspension of fluorochrome-containing microspheres for its calibration (Flow Count Fluorospheres, Beckman Coulter Inc.).

Growth rates ( $\mu$ ), expressed as day<sup>-1</sup>, were calculated using the following equation:

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

where  $N_t$  is the cell density at time  $t$  and  $N_0$  is the cell density at time 0.

Growth inhibition was determined by comparing the cell density of the treated cultures with the cell density of the control cultures (zero inhibition).

### 2.3.2. Relative cell size

Cultures were analysed by flow cytometry to study potential alterations in cell size after 24 h of exposure to each pollutant. Forward light scatter (FS) is related to cell size or volume and FS intensity increases with the increase of cell cross-sectional area (Mullaney et al., 1969). At least,  $5 \times 10^3$  cells for sample were analysed and data were presented as FS arbitrary units (a.u.).

### 2.3.3. Cell viability

Cell viability was estimated using the fluorescent emission of cells stained with propidium iodide (PI). PI is a fluorescent dye that intercalates with double stranded nucleic acids to produce red fluorescence when excited by blue light. Because of its polarity, it is unable to pass through intact cell membranes; however, when a cell dies the integrity of the cell membrane fails, and PI is able to enter and stain the nucleic acids. In this way, PI can be used to discriminate between viable non-fluorescent cells (PI-) and non-viable fluorescent cells (PI+) (Cid et al., 1996b; Prado et al., 2009a).

PI-derived fluorescence was detected in FL3 detector (600–645 nm) in a logarithmic scale. This assay was performed following the method described by Prado et al. (2009a) using aliquots of  $5 \times 10^3$  cells mL<sup>-1</sup>. At least  $10^4$  cells were analysed per culture. Results were obtained as the percentage of viable cells versus the total amount of analysed cells.

### 2.3.4. Metabolic activity

Metabolic activity was studied using a fluorescein diacetate-based cell esterase activity assay, which has been reported as a sensitive and rapid technique to assess phytoplankton metabolic activity (Jochem, 2000; Peperzak and Brussaard, 2011). Fluorescein diacetate (FDA) is a non-polar, non-fluorescent lipophilic molecule that freely diffuses across cell membranes. Inside the cell, non-specific esterases break the FDA molecule into one brightly fluorescing fluorescein and two acetates. Due to its high polarity, the fluorescein is trapped within cells exhibiting intact plasma membranes. Therefore fluorescence intensity will increase depending on the metabolic activity of those esterases.

Since fluorescein is accumulated by active cells, metabolic activity can be measured by means of the fluorescent intensity signal emitted by cells, which is proportional to the amount of accumulated fluorescein and the time elapsed (Prado et al., 2009a). Comparing any differences in the fluorescence emitted by metabolically active cells (FDA+), it is possible to detect changes in cell activity.

FDA-derived fluorescence was detected in FL1 detector (505–550 nm) in a logarithmic scale. This assay was performed following the method described by Prado et al. (2009a) using aliquots of  $5 \times 10^3$  cells mL<sup>-1</sup> and the FDA at a final concentration of  $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ . At least  $10^4$  cells were analysed per culture. Results are expressed as the mean fluorescence value (a.u.) of metabolically active cells population (FDA+) that is related with the cell activity.

### 2.3.5. Chlorophyll *a* autofluorescence

*T. suecica* presents natural fluorescence due to the presence of chlorophyll *a* and other accessory pigments. Chlorophyll *a* is excited by blue light at 488 nm and emits fluorescence in the range of 680–720 nm (red fluorescence) which is collected by the FL4 detector. Therefore this parameter is studied directly from cell suspensions without using any fluorochrome. A minimum of  $5 \times 10^3$  cells were analysed and the mean fluorescence value (a.u.) of the cell population was calculated.

### 2.4. Spectrophotometric determination of chlorophyll *a*

The chlorophyll *a* content of *T. suecica* was analysed by spectrophotometry. Cells were collected by centrifugation of culture

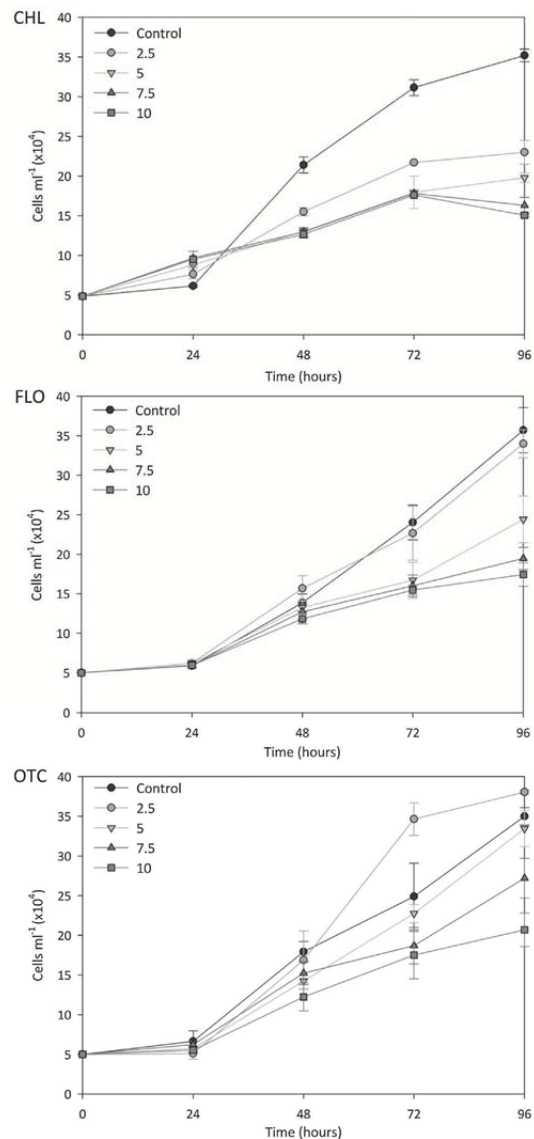


Fig. 1. Growth curves of the cultures of *T. suecica* in the absence (Ct) and in the presence of different concentrations ( $\text{mg L}^{-1}$ ) of chloramphenicol (CHL), florphenicol (FLO) and oxytetracycline (OTC). Values are the mean (three replicates) of number of cells per mL in each treatment  $\pm$  standard deviation.

aliquots at 8000 g and  $4^\circ\text{C}$  for 20 min. Pigments were extracted in 90% acetone in the dark at  $4^\circ\text{C}$  during 24 h. Then, samples were centrifuged again. The supernatant, which contains cell pigments, was decanted off to read the absorbances and the pellet was discarded. Absorbances were read at 664 and 647 nm on the spectrophotometer. The chlorophyll *a* concentration was calculated using the following equation (Jeffrey and Humphrey, 1975):

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

where Chlorophyll *a* represents the concentration in  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $A_{664}$  and  $A_{647}$  are the absorbances read at 664 and 647 nm respectively.

### 2.5. Data analysis

Mean and standard deviation values of the three biological replicates were calculated for each treatment and for the control. In all cases, data are given as mean values  $\pm$  standard deviation of the mean.

To determine significant differences among test concentrations, data were statistically analysed by an overall one-way analysis of variance (ANOVA) using IBM SPSS Statistic 21.0.0 software. A *p*-value  $< 0.05$  was considered statistically significant. When significant differences were observed, means were compared using the multiple-range Duncan test at a level of significance of 0.05 ( $p < 0.05$ ).

IC<sub>50</sub> values were calculated using linear regression analysis of the logarithm of antibiotic concentration versus percentage of inhibition.

## 3. Results

### 3.1. Growth

In general, the antibiotics assayed showed inhibitory effects on the growth of *T. suecica* (Fig. 1). The presence of the antibiotics tested in the culture medium significantly ( $p < 0.05$ ) affected cell division of *T. suecica* and this negative effect on growth was concentration-dependent ( $p < 0.05$ ). However, in the case of OTC growth was slightly enhanced at the lowest concentration assayed (2.5 mg L<sup>-1</sup>) and no significant differences were found between control and cultures exposed to 5 mg L<sup>-1</sup>.

After 96 h of exposure to antibiotics, cultures exhibited growth rates ( $\mu$ ) lower than control, and these growth rates decreased as the antibiotic concentration increased (Table 1). Statistical analysis showed a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in growth at concentrations equal or higher than 2.5 mg L<sup>-1</sup> for CHL; 5 mg L<sup>-1</sup> for FLO and 7.5 mg L<sup>-1</sup> for OTC (Table 1). The highest concentration assayed (10 mg L<sup>-1</sup>) of CHL and FLO caused the maximum decrease in growth rate detected in this assay with 36.8 and 36.6% less than the control, respectively; whereas the highest concentration of OTC caused the minimum decrease detected in growth rate, with 23.9% less than the control. IC<sub>50</sub> values of CHL, FLO and OTC determined after 96 h were 11.16, 9.03 and 17.25 mg L<sup>-1</sup> respectively. Based on the IC<sub>50</sub> values obtained, the antibiotics can be ranked according to toxicity level as follows: FLO > CHL > OTC.

**Table 1**

Growth rate ( $\mu$ ) of *T. suecica* cultures after 96 h of exposure to different concentrations of chloramphenicol (CHL), florphenicol (FLO) and oxytetracycline (OTC). Values are the mean (three replicates)  $\pm$  standard deviation. Significant differences with respect to control at a level of significance of 0.05 ( $p < 0.05$ ) are represented by an asterisk (\*).

Antibiotic (mg L <sup>-1</sup> )	$\mu$ (day <sup>-1</sup> )		
	CHL	FLO	OTC
Control	0.68 $\pm$ 0.05	0.71 $\pm$ 0.03	0.71 $\pm$ 0.05
2.5	0.59 $\pm$ 0.04*	0.69 $\pm$ 0.02	0.74 $\pm$ 0.02
5	0.53 $\pm$ 0.03*	0.57 $\pm$ 0.04*	0.69 $\pm$ 0.02
7.5	0.48 $\pm$ 0.07*	0.49 $\pm$ 0.03*	0.62 $\pm$ 0.03*
10	0.43 $\pm$ 0.03*	0.45 $\pm$ 0.03*	0.54 $\pm$ 0.05*

### 3.2. Relative cell size

After 24 h of exposure, the presence of the antibiotics tested in culture medium caused a decrease in the FS signal, related to a decrease in the cell volume of *T. suecica*. Relative cells size significantly ( $p < 0.05$ ) decreased as antibiotic concentration increased (Fig. 2). At the highest concentration tested (10 mg L<sup>-1</sup>), CHL and OTC substantially reduced relative cell size with respect to control cells, but the most drastic decrease in relative cell size was detected with FLO.

### 3.3. Cell viability

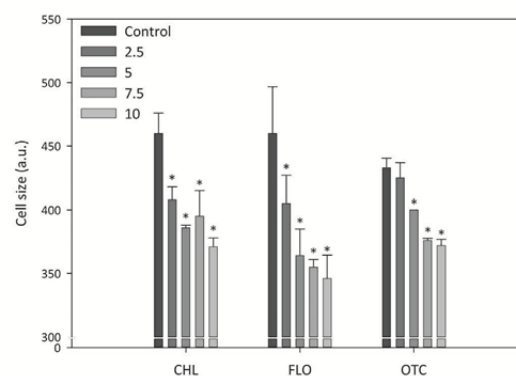
Cell viability in *T. suecica* cultures assayed by FCM was not significantly ( $p < 0.05$ ) affected by the addition of these three antibiotics tested to the medium. None of the antibiotics assayed, even at the highest concentration tested, affected cell viability of *T. suecica*, that remained close to 100% for all antibiotic concentrations assayed (data not shown). Cell membranes were not altered and therefore, cells remained viable throughout the duration of the test.

### 3.4. Metabolic activity

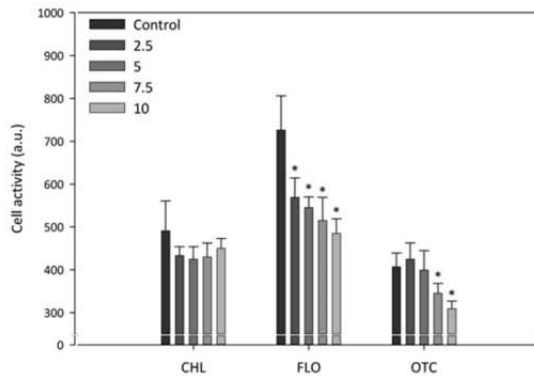
After 24 h of exposure, the cell activity was significantly affected by antibiotics in a concentration-dependent way, except for CHL ( $p < 0.05$ ). The lowest concentration assayed of FLO significantly ( $p < 0.05$ ) reduced the cell activity of *T. suecica*, whereas the highest concentrations of OTC (7.5 mg L<sup>-1</sup> and 10 mg L<sup>-1</sup>) showed a significant ( $p < 0.05$ ) reduction in cell activity. Furthermore, a non-significant ( $p < 0.05$ ) elevation of activity at 2.5 mg L<sup>-1</sup> of OTC was detected (Fig. 3).

### 3.5. Chlorophyll *a*

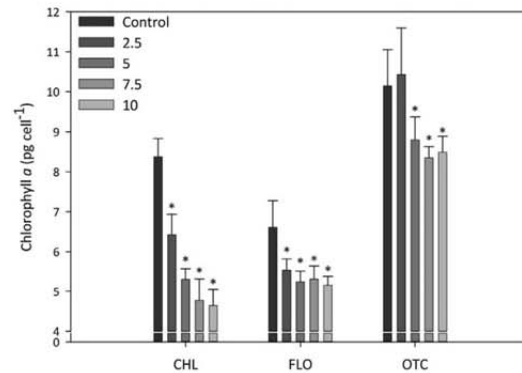
Since differences in cellular volume of the different treatments were observed, chlorophyll *a* autofluorescence is expressed corrected by relative cell size (ratio FL4/FS), thereby avoiding autofluorescence variability due to differences in relative cell volume (Fig. 4). After 24 h, cultures exposed to the antibiotics showed a significant ( $p < 0.05$ ) increase in the values of the autofluorescence.



**Fig. 2.** Relative cell size of *T. suecica* after 24 h of exposure to different concentrations of chloramphenicol (CHL), florphenicol (FLO) and oxytetracycline (OTC) (mg L<sup>-1</sup>). Data are given as mean values  $\pm$  standard deviation of the FS signal. Significant differences with respect to control at a level of significance of 0.05 ( $p < 0.05$ ) are represented by an asterisk (\*).



**Fig. 3.** Metabolic activity of *T. suecica* cells after 24 h of exposure to different concentrations of chloramphenicol (CHL), florphenicol (FLO) and oxytetracycline (OTC) ( $\text{mg L}^{-1}$ ). Data are given as mean values  $\pm$  standard deviation. Significant differences with respect to control at a level of significance of 0.05 ( $p < 0.05$ ) are represented by an asterisk (\*).

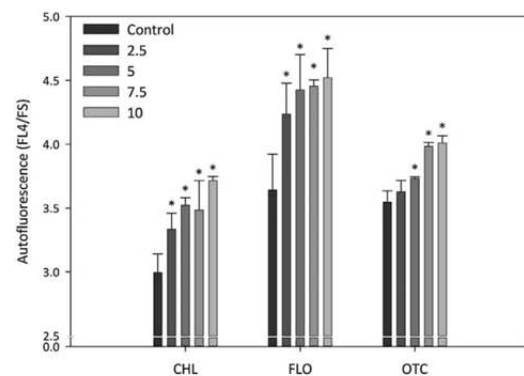


**Fig. 5.** Chlorophyll *a* content of the cultures of *T. suecica* after 24 h of exposure to different concentrations ( $\text{mg L}^{-1}$ ) of chloramphenicol (CHL), florphenicol (FLO) and oxytetracycline (OTC). Data are given as mean values  $\pm$  standard deviation. Significant differences with respect to control at a level of significance of 0.05 ( $p < 0.05$ ) are represented by an asterisk (\*).

As drug concentration increased, the intensity of the fluorescence also increased. All three antibiotics enhanced the intensity of the autofluorescence emitted, but the most relevant increase was obtained in the presence of FLO and CHL. Chlorophyll *a* content was also affected by the presence of antibiotics in the culture medium. All antibiotic treatments significantly ( $p < 0.05$ ) reduced pigment cell content compared to control cultures, except for the OTC at 2.5  $\text{mg L}^{-1}$  (Fig. 5). At the highest concentration assayed, the amount of chlorophyll *a* per cell was reduced in a 45% in the presence of CHL, 22% for FLO and 35% for OTC relative to the control cultures.

#### 4. Discussion

In the last years, pharmaceuticals have been receiving an increasing attention regarding their potential harmful effects on the environment (Halling-Sørensen et al., 1998). In particular,



**Fig. 4.** Chlorophyll *a* autofluorescence expressed as the ratio between the chlorophyll *a* fluorescence and the relative cell size of the cultures of *T. suecica* after 24 h of exposure to different concentrations ( $\text{mg L}^{-1}$ ) of chloramphenicol (CHL), florphenicol (FLO) and oxytetracycline (OTC). Data are given as mean values  $\pm$  standard deviation. Significant differences with respect to control at a level of significance of 0.05 ( $p < 0.05$ ) are represented by an asterisk (\*).

antibiotics are of particular concern for marine ecosystems since they are extensively used in aquaculture and they also may reach the environment by other ways such as urban and industrial effluents (Migliore et al., 1997; Wollenberger et al., 2000).

The three antibiotics assayed in this study alter the growth of the microalgae *T. suecica*. The IC<sub>50</sub> values (96 h) obtained for the three antibiotics are close to the values reported for other microalgal species in the literature. In this way, De Orte et al. (2013) found 96 h OTC IC<sub>50</sub> values of 1.73 and 6.43  $\text{mg L}^{-1}$  to *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis galbana*, respectively. In the study of Lai et al. (2009) the 96 h IC<sub>50</sub> of FLO to *I. galbana* was 8.00  $\text{mg L}^{-1}$  and the 96 h IC<sub>50</sub> of CHL to *Tetraselmis chuii* was 4.00  $\text{mg L}^{-1}$ . These results suggest that microalgae, despite being non-target organisms, are strongly affected by antibiotics.

Obtained results show that *T. suecica* is significantly affected by the presence of these antibiotics in the medium. Therefore, in the case of CHL, a better control or government regulation and law enforcement should be exercised about its illegal use in aquaculture. Despite being banned in many countries, its broad spectrum of activity, ready availability and low cost attracts some producers (Huang et al., 2006). For the OTC, the IC<sub>50</sub> value obtained was higher than for the other two antibiotics, therefore, this compound seems less harmful for this species than the others tested. FLO is an antibacterial agent especially developed for veterinary use, being applied even against bacteria that have developed resistance to other antibacterial drugs and it is less persistent in the aquatic environment than OTC. In addition, although it is a structural CHL analogue, FLO has a broader spectrum of activity and has no toxic effects in humans (Xu et al., 2005); because of this, the use of this drug has increased in recent years. However, in this study FLO significantly inhibited the growth of the marine microalgae *T. suecica*, showing much higher toxicity than the two other antibiotics assayed. Therefore, the use of this antibiotic should be more carefully monitored to reduce the potential contamination risk of the receiving waters.

Since cultures were not axenic, alterations observed on growth in the presence of antibiotics could also be due to the lack of some growth factors or vitamins synthesized by associated bacteria, which could be affected. In the case of OTC, the stimulation of growth at the lowest concentration tested could be explained by a phenomenon of hormesis. Although the biochemical mechanism

by which hormesis works is not well understood, it is possible that low doses of the drug might activate the repair mechanisms of the cell.

Except for growth, the remaining parameters were evaluated after 24 h of antibiotic exposure, when growth was not significantly affected (Fig. 1).

The presence of a proportion of smaller cells in cultures with antibiotics may be explained by the inhibition of growth detected (Fig. 2). Active cells enlarged before dividing because of the increase in cellular constituents. But cells exposed to antibiotics did not increase their volume as fast as the control cultures because they had their growth inhibited.

Toxic effects of these pollutants on microalgae are generally evaluated using phytotoxicity tests based on growth inhibition, a population-based parameter. However, physiological cellular endpoints could allow early detection of cell stress and elucidate underlying toxicity mechanisms (Prado et al., 2009a). In this regard, the measurement of cell viability and enzyme inhibition in microalgae are rapid and sensitive indicators of environmental stress (Blaise and Ménard, 1998). Results obtained with the FDA test provide additional information to that obtained with the PI test. Although both assay procedures can distinguish between cells with an intact plasma membrane (viable) and cells with a damaged membrane (not viable), the FDA assay also includes those cells with intact plasma membrane, but with altered esterase activity.

Several studies have shown that some toxic agents such as copper or some pesticides may damage the integrity of microalgal membranes causing a decrease in the percentage of viable cells (Cid et al., 1996b; Lage et al., 2001; Prado et al., 2009a). Reactive oxygen species (ROS) generated by these agents have been linked to the origin of the damage to cell membranes. It has also been found that exposure to low concentrations of these agents stimulate cell esterase activity since these enzymes are essential for the replacement of phospholipids in cell membranes (Franklin et al., 2001). However, in this study, an opposite effect was detected. On one hand, cell viability of the cells of *T. suecica* analysed by CMF using PI was not affected by the presence of antibiotics in the culture medium and on the other hand, the FDA test detected a decrease in metabolic activity (Fig. 3). This could be explained because chloroplasts and mitochondria have their origin in primitive bacteria and these organelles may be the target of the antibiotics in microalgae, so these drugs could alter cell physiological state, but not its integrity or viability (Ebringer, 1972; Nicolas, 1981; Liu et al., 2012).

Regarding cell chlorophyll *a* content, a significant decrease was observed in cultures exposed to antibiotics (Fig. 5). Hendry and Price (1993) reported the loss of chlorophyll associated with environmental stress. Several studies have shown that some compounds such as carbamazepine can strongly inhibit the synthesis of chlorophyll (Tsiaka et al., 2013). This inhibitory effect is probably due to the interference of these pollutants with the chlorophyll synthesis (Zhang et al., 2012). Furthermore, the decrease in the cellular content of pigments could be caused by the enhancement of oxidative stress-related effects (Tsiaka et al., 2013), since these are one of the most important causes of degradation of pigments in plants.

Although the green alga is a non-target organism, the observed toxicity exerted by some antibiotics could be, at least in part, due to the prokaryote-like elements of chloroplast metabolism and reproduction, which makes these plastids potential antibiotic targets (McFadden and Roos, 1999; González-Pleiter et al., 2013). Due to the similarities between the ribosomal RNA of bacteria and chloroplasts, chloroplast ribosomes are sensitive to many antibiotics (Gray, 1992). Proteins of the photosynthetic apparatus are

synthesized in chloroplasts (Mayfield et al., 1995), thus damage to chloroplast ribosomes would cause harmful effects to photosynthetic organisms, affecting the chlorophyll synthesis (Liu et al., 2012). In the same way, antibiotics may cause similar effects on the mitochondria, as some antibiotics such as chloramphenicol, inhibits mitochondrial protein synthesis in eukaryotic cells (McKee et al., 2006; Yunis, 1989). Mitochondrial ribosomes are involved in the synthesis of proteins implicated in electron transport, which is essential for energy metabolism and cellular respiration process, therefore the study of these parameters in microalgal cells exposed to antibiotics would also be interesting.

Changes in chlorophyll fluorescence have been used to study the physiological state of microalgal cells under several stress factors (González-Barreiro et al., 2004; Chalifour et al., 2009; Hadjoudja et al., 2009). Although treated cells decreased in size and in chlorophyll *a* content, an increase in chlorophyll *a* fluorescence was detected. The increase of the autofluorescence could be explained by a blockage of the electron transport chain at the PS II level (Cid et al., 1995), indicating an inhibitory effect localised on the oxidant side, probably due to inactivation of some PS II reaction centres as postulated by Samson and Papovic (1988) in their study of phytotoxicity of heavy metals and pesticides in the microalga *Dunaliella tertiolecta*. It has also been reported by Singh and Singh (1987) and by Murthy et al. (1990) in cells exposed to the action of copper and mercury, respectively.

Taken into account the obtained results, chloramphenicol, florphenicol and oxytetracycline provoke adverse effects on the marine microalgae *T. suecica*.

## 5. Conclusions

The three antibiotics tested caused significant alterations on the microalga and the most affected parameters were those related to photosynthesis and growth.

Before growth was affected, cellular content and autofluorescence of chlorophyll *a* of the microalga were altered by the presence of antibiotics in the environment, and this may adversely affect the photosynthetic rate. This effect could be due to the cyanobacterial nature of chloroplasts which makes these plastids potential antibiotic targets.

Flow cytometry provides additional information to the ecotoxicological studies, which are often based on growth inhibition assays. It can be concluded that cellular physiological parameters studied by flow cytometry can allow us to detect early alterations that classical studies of growth inhibition do not detect.

Further studies about the toxicity of the mixtures of antibiotics should be carried out to detect possible interactions (synergism or antagonism) among these compounds in the environment.

## References

- Aminov, R.I., 2010. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front. Microbiol.* 1, 134.
- Blaise, C., Ménard, L., 1998. A micro-algal solid phase test to assess the toxic potential of freshwater sediments. *Water Qual. Res. J. Can.* 33, 133–151.
- Blanco, M.M., Liebana, P., Gibello, A., Alcalá, C., Fernández-Garayzábal, J.F., Domínguez, L., 2004. Principales patologías bacterianas en la piscicultura española. *REDVET – Revista Electrónica de Veterinaria*. Available on: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020204.html>. Viewed: 4 September 2013.
- Burka, J.F., Hammell, K.L., Horsberg, T.E., Johnson, G.R., Rainnie, D.J., Speare, D.J., 1997. Drugs in salmonid aquaculture – a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 20, 333–349.
- Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8 (7), 1137–1144.
- Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, M., Saoncella, A., 2001. An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Res.* 35 (1), 69–76.

- Carballeira, C., Ramos-Gómez, J., Martín-Díaz, M.L., DeValls, T.A., Carballeira, A., 2012. Designing an integrated environmental monitoring plan for land-based marine fish farms located at exposed and hard bottom coastal areas. *J. Environ. Monit.* 14, 1305–1316.
- Chalifour, A., Spear, P.A., Boily, M.H., DeBlois, C., Giroux, L., Dassylva, N., Juneau, P., 2009. Assessment of toxic effects of pesticide extracts on different green algal species by using chlorophyll *a* fluorescence. *Toxicol. Environ. Chem.* 91, 1315–1329.
- Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline antibiotics: mode of actions, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 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.
- Cid, A., Herrero, C., Abalde, J., 1996a. Functional analysis of phytoplankton by flow cytometry: a study of the effect of copper on a marine diatom. *Sci. Mar.* 60 (1), 303–308.
- Cid, A., Herrero, C., Torres, E., Abalde, J., 1995. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquat. Toxicol.* 31, 165–174.
- Couderchet, M., Vernet, G., 2003. Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 271–277.
- De Orte, M.R., Carballeira, C., Viana, I.G., Carballeira, A., 2013. Assessing the toxicity of chemical compounds associated with marine land-based fish farms: the use of mini-scale microalgal toxicity test. *Chem. Ecol.* 29 (6), 554–563.
- De Lorenzo, M.E., Fleming, J., 2008. Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals and personal care products on the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54 (2), 203–210.
- Ebringer, L., 1972. Are plastids derived from prokaryotic microorganisms? Action of antibiotics on chloroplasts of *Euglena gracilis*. *J. Gen. Microbiol.* 71 (1), 35–52.
- Fabregas, J., Otero, A., Domínguez, A., Patiño, M., 2001. Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. *J. Mar. Biotechnol.* 3, 256–263.
- Fabregas, J., 1982. Las microalgas como eslabón de infraestructura en la Microbiología Marina: aislamiento, caracterización, ciclo celular y aprovechamiento tecnológico. Universidad de Santiago de Compostela (Tesis Doctoral).
- Ferreira, C.S.G., Nunes, B.A., Henriques-Almeida, J.M.M., Guilhermino, L., 2007. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 452–458.
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Lim, R.P., 2001. Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 160–170.
- Franqueira, D., Cid, A., Torres, E., Orosa, M., Herrero, C., 1999. A comparison of the relative sensitivity of structural and functional cellular responses in the alga *Chlamydomonas eugametos* exposed to the herbicide paraquat. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 264–269.
- 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*. *Aquat. Toxicol.* 83 (2), 149–158.
- González-Barreiro, O., Rioboo, C., Cid, A., Herrero, C., 2004. Atrazine induced chlorosis in *Synechococcus elongatus* cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 301–307.
- González-Pleiter, M., González, S., Rodea-Palmares, 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 Res.* 47, 2050–2064.
- Gray, M.W., 1992. The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.* 141, 233–357.
- Gulkowska, A., He, Y., So, M.K., Yeung, L.W.Y., Leung, H.W., Giesy, J.P., Lam, P.K.S., Martin, M., Richardson, B.J., 2007. The occurrence of selected antibiotics in Hong Kong coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 54 (8), 1287–1293.
- Hadjoudja, S., Vignoles, C., Delucht, V., Lenain, J.F., Le Jeune, A.H., Baudu, M., 2009. Short term copper toxicity on *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris* using flow cytometry. *Aquat. Toxicol.* 94, 255–264.
- Halling-Sørensen, B., 2000. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere* 40, 731–739.
- Halling-Sørensen, B., Nielsen, S.N., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Lützheft, H.C.H., Jørgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substance in the environment – a review. *Chemosphere* 36, 357–393.
- Hendry, G.A.F., Price, A.H., 1993. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: Hendry, G.A.F., y Grime, J.P. (Eds.), *Methods in Comparative Plant Ecology*. Chapman & Hall, London, pp. 148–152.
- Hernando, M.D., Mezúa, M., Fernández-Alba, A.R., Barceló, D., 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69 (2), 334–342.
- Herrero, C., Cid, A., Fabregas, J., Abalde, J., 1991. Yields in biomass and chemical constituent of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquacult. Eng.* 10 (2), 99–110.
- Huang, Z.Y., Sun, M.Y., Li, S., Huang, G.L., 2006. Pharmacokinetics of chloramphenicol in carp (*Cyprinus carpio* L.) after drug administration. *Aquacult. Res.* 37, 1540–1545.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Parrella, A., 2005. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Sci. Total Environ.* 346, 87–98.
- 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. *Biochem. Physiol. Pflanz* 167, 191–194.
- Jochem, F.J., 2000. Probing the physiological state of phytoplankton at the single-cell level. *Sci. Mar.* 64 (2), 183–195.
- Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment – a review – Part I. *Chemosphere* 75, 417–434.
- 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.
- Lai, H.T., Hou, J.H., Su, C.I., Chen, C.I., 2009. Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis chuii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 329–334.
- Liu, W., Ming, Y., Huang, Z., Li, P., 2012. Impacts of florfenicol on marine diatom *Skeletonema costatum* through photosynthesis inhibition and oxidative damages. *Plant Physiol. Biochem.* 60, 165–170.
- Marconi, R., Lodmell, J., Hill, W., 1990. Identification of a rRNA/Chloramphenicol interaction site within the peptidyltransferase center of the 50S subunit of the *Escherichia coli* ribosome. *J. Biol. Chem.* 265 (14), 7894–7899.
- Mayfield, S.P., Yohn, C.B., Cohen, A., Danon, A., 1995. Regulation of chloroplast gene expression. *Annu. Rev. Plant Biol.* 46, 147–166.
- McCormick, P.V., Cairns, J.J., 1994. Algae as indicators of environmental change. *J. Appl. Phycol.* 6, 509–526.
- McFadden, G.I., Roos, D.S., 1999. Apicomplexan plastids as drug targets. *Trends Microbiol.* 7 (8), 328–333.
- McKee, E.E., Ferguson, M., Bentley, A.T., Marks, T.A., 2006. Inhibition of mammalian mitochondrial protein synthesis by oxazolidinones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (6), 2042–2049.
- Migliore, L., Civitareale, C., Brambilla, G., DiDelupis, G.D., 1997. Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*. *Water Res.* 31 (7), 1801–1806.
- Mullaney, P.F., Van Dilla, M.A., Coulter, J.R., 1969. Cell sizing: a light scattering photometer for rapid volume determination. *Rev. Sci. Instrum.* 40, 1029–1034.
- Murthy, S.D.S., Bukhov, N.G., Mohanty, P., 1990. Mercury-induced alterations of chlorophyll *a* fluorescence kinetics in cyanobacteria: multiple effects of mercury on electron transport. *J. Photochem. Photobiol. B* 6, 373–380.
- Nestler, H., Groh, K.J., Schönenberger, R., Behra, R., Schirmer, K., Eggen, R.L.L., Suter, M.J.-F., 2012. Multiple-endpoint assay provides a detailed mechanistic view of responses to herbicide exposure in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 110–111, 214–224.
- Nicolas, P., 1981. Sensitivity of *Euglena gracilis* to chloroplast – inhibiting antibiotics, and properties of antibiotic – resistant mutants. *Plant. Sci.* 22, 309–317.
- Peperzak, L., Brussaard, C.P.D., 2011. Flow cytometric applicability of fluorescent vitality probes on phytoplankton. *J. Phycol.* 47 (3), 692–702.
- 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. *Environ. Int.* 35, 240–247.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2009b. The herbicide paraquat induces alterations in the elemental and biochemical composition of non-target microalgal species. *Chemosphere* 76, 1440–1444.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2012b. Screening acute cytotoxicity biomarkers using a microalga as test organism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 86, 219–226.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Suárez-Bregua, P., Cid, A., 2012a. Flow cytometric analysis to evaluate physiological alterations in herbicide-exposed *Chlamydomonas moewusii* cells. *Ecotoxicology* 21, 409–420.
- Rioboo, C., González, O., Herrero, C., Cid, A., 2002. Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. *Aquat. Toxicol.* 59, 225–235.
- Rioboo, C., Prado, R., Herrero, C., Cid, A., 2007. Population growth study of the rotifer *Brachionus* sp. fed with triazine-exposed microalgae. *Aquat. Toxicol.* 83, 247–253.
- Samson, G., Papovic, R., 1988. Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 16, 272–278.
- Singh, D.P., Singh, S.P., 1987. Action of heavy metals on Hill activity and O<sub>2</sub> evolution in *Anacystis nidulans*. *Plant Physiol.* 83, 12–14.
- Tsiaka, P., Tsarpali, V., Ntaikou, I., Kostopoulou, M.N., Lyberatos, G., Dailianis, S., 2013. Carbamazepine-mediated pro-oxidant effects on the unicellular marine algal species *Dunaliella tertiolecta* and the hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology* 22, 1208–1220.
- Uriarte, I., Farias, A., Castilla, J.C., 2001. Effect of antibiotic treatment during larval development of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquacult. Eng.* 25, 139–147.
- Wollenberger, L., Halling-Sørensen, B., Kusk, K.O., 2000. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia Magna*. *Chemosphere* 40, 723–730.
- Xu, L.W., Liao, C.R., Liu, G.F., 2005. Security about florfenicol used in aquaculture. *J. Fish. Sci. China* 12, 512–518.
- Xu, W., Zhang, G., Zou, S., Li, X., Liu, Y., 2007. Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Environ. Pollut.* 145 (3), 672–679.
- Yunis, A.A., 1989. Chloramphenicol toxicity: 25 years of research. *Am. J. Med.* 87, 44–48.
- Zhang, W., Zhang, M., Lin, K., Sun, W., Xiong, B., Guo, M., Cui, X., Fu, R., 2012. Ecotoxicological effect of carbamazepine on *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33 (2), 344–352.





## 4.2. Capítulo II: Citotoxicidad del omeprazol, un fármaco inhibidor de la bomba de protones, en la microalga marina *Tetraselmis suecica*.

El omeprazol (OMP) es uno de los medicamentos más consumidos en todo el mundo. Pertenece a un grupo de fármacos denominado inhibidores de la bomba de protones que actúan bloqueando irreversiblemente la enzima  $H^+/K^+$ -ATPasa de las células parietales de la mucosa gástrica. De este modo se reduce la secreción de ácido gástrico, por lo que se utiliza en el tratamiento de ciertos trastornos gastrointestinales. Aunque se consume diariamente en grandes cantidades, es un compuesto poco estudiado y se conoce relativamente poco sobre su ecotoxicidad.

El objetivo de este capítulo se centra en evaluar el potencial efecto tóxico del OMP en la microalga marina *T. suecica*. Tras 24 h de exposición a distintas concentraciones de OMP (80, 100, 120 y 140 mg L<sup>-1</sup>) se analizaron, además del parámetro tradicional de inhibición de crecimiento y la cuantificación espectrofotométrica de clorofila *a*, diferentes parámetros fisiológicos y bioquímicos por CMF, que podrían ser considerados como potenciales marcadores tempranos de citotoxicidad en microalgas.

Los resultados obtenidos muestran que el OMP causa un descenso significativo en la tasa de crecimiento, el contenido celular de clorofila *a* y en la autofluorescencia microalgal, un incremento del volumen, complejidad celular y producción de ROS, hiperpolarización de las membranas citoplasmática y mitocondrial, acidificación intracelular y además, la pérdida de viabilidad en los cultivos expuestos a las concentraciones más altas ensayadas. Sin embargo, las células viables mostraron un aumento de la actividad metabólica en respuesta al estrés producido por el fármaco.

El aumento del tamaño de las células microalgales detectado puede deberse a la incapacidad de las células de completar el ciclo celular y finalizar la división. Además, las alteraciones observadas en el potencial de membrana citoplasmático pueden dar lugar a cambios osmóticos y fallos en los procesos de control del volumen celular.

El descenso de la autofluorescencia detectado, se relaciona con la disminución en el contenido celular de clorofila *a* o con daños oxidativos a nivel del PSII,

consecuencia de la generación de ROS. Además, el estrés oxidativo está implicado en la disrupción y alteración de las membranas biológicas mediante inducción de la peroxidación lipídica y la lisis o desesterificación de ácidos grasos, dando lugar, en último término a la muerte celular, como se refleja en el descenso de la viabilidad obtenido. De este modo, la sobreproducción de ROS puede también explicar el aumento de la complejidad intracelular debido a la degradación y desorganización de orgánulos celulares como resultado de la interacción de estas especies reactivas con los lípidos de las membranas. Por otro lado, algunas células vegetales también generan ROS como moléculas de señalización en el control de diversas respuestas celulares al estrés, como la inducción de genes de defensa, movilización de sistemas de transporte de iones o la muerte celular programada.

El incremento de la actividad esterasa en la población de células que permanece viable puede deberse a una estimulación metabólica general inducida por el agente tóxico con el fin de adaptar su fisiología a las condiciones ambientales adversas, pudiendo estar también relacionado con la activación de procesos de detoxificación en los que participan estas enzimas.

Los cambios observados en los potenciales de membrana se asocian a la acción inhibitoria del OMP sobre las bombas de protones de las membranas citoplasmática y mitocondrial. En las células vegetales, el potencial de membrana citoplasmático se crea debido al transporte asimétrico de protones ( $H^+$ ) gracias a la actividad de bombas como las ATPasas que transportan  $H^+$  al exterior celular (en el caso de aquellas que están localizadas en la membrana plasmática) y al interior de la vacuola (en el caso de aquellas localizadas en el tonoplasto). El transporte iónico afecta a la distribución de la carga a través de la membrana y por tanto, a su voltaje. Por otro lado, durante la respiración aeróbica, el movimiento de electrones a través de la cadena de transporte electrónico genera un bombeo de  $H^+$  de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana que se traduce en un gradiente electroquímico aprovechado por las ATP-sintasas para generar ATP. Por lo que el potencial de membrana mitocondrial se relaciona con la capacidad de la célula de generar ATP mediante la fosforilación

oxidativa y cambios en este potencial podrían alterar la producción de energía y dar lugar a una sobreproducción de ROS.

La regulación del pH intracelular involucra, entre otros, el transporte y la compartimentalización de  $H^+$ . La presencia de OMP en el ambiente marino puede inhibir la actividad de las bombas que envían  $H^+$  al exterior celular y al interior de vacuolas y que regulan de este modo los gradientes de pH. Esto genera una acumulación de  $H^+$  en el citosol que se refleja en la acidificación intracelular observada.

En definitiva, el OMP puede afectar receptores en organismos unicelulares no diana que regulen el flujo de protones en el citosol, alterando la homeostasis celular y provocando una sobreproducción de ROS que da lugar, en último término, a la muerte celular.

A continuación, se adjunta la correspondiente publicación.

Seoane, M., Esperanza, M., Cid, Á., 2017. Cytotoxic effects of the proton pump inhibitor omeprazole on the non-target marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Aquatic Toxicology* 191, 62-72.

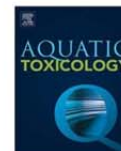
doi: 10.1016/j.aquatox.2017.08.001





Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aqtox](http://www.elsevier.com/locate/aqtox)

Research Paper

## Cytotoxic effects of the proton pump inhibitor omeprazole on the non-target marine microalga *Tetraselmis suecica*



Marta Seoane, Marta Esperanza, Ángeles Cid\*

Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus da Zapateira s/n, 15071, A Coruña, Spain

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Microalga  
Emerging pollutants  
Pharmaceuticals  
Proton pump inhibitor  
Flow cytometry  
Cytotoxicity

## ABSTRACT

Omeprazole (OMP) is one of the most commonly used drugs for the treatment of gastro-intestinal disorders. Although it is daily consumed in high quantities and commonly detected in waters worldwide, relatively little is known about its ecotoxicity. The aim of this study was to evaluate the potential acute toxicity of increasing concentrations of OMP on the marine microalga *Tetraselmis suecica* analysing several cytotoxicity biomarkers by flow cytometry after 24 h of exposure. Results showed that OMP caused a decrease in growth and auto-fluorescence, an increase in cellular volume and intracellular complexity, hyperpolarization of cytoplasmic and mitochondrial membranes and intracellular acidification. In addition, large amounts of reactive oxygen species (ROS) were generated which resulted in a decrease in the percentage of the viable population. However, the viable population showed an increase in their metabolic activity as an early response to overcome the stress. In conclusion, OMP may affect proton pumps in non-target organisms such as microalgae; it disturbed pH homeostasis and provoked an early accumulation of ROS that resulted in a rapid cell death in cells exposed to the highest concentration assayed.

## 1. Introduction

Marine ecosystems are continuously loaded with foreign organic chemicals released by urban communities and industries. Pharmaceuticals are biologically active substances designated for use in the medical diagnosis, cure, treatment, or prevention of diseases (Christen et al., 2010). Their increased overall consumption in human and veterinary medicine and the increasing number of active substances being sold will pose an increasing environmental risk (Kümmerer, 2010). These compounds are designed to target specific metabolic and molecular pathways in humans or animals, but when introduced into the environment they may affect the same pathways in other organisms having identical or similar target organs, tissues, cells or biomolecules (Cleuvers, 2003; Fent et al., 2006). Therefore, determination of the toxicity to non-target species is beneficial to understand the impact of these chemicals to aquatic ecosystems (Geiger et al., 2016; Villain et al., 2016). Pharmaceuticals have been found to be ubiquitously present in wastewater treatment plant (WWTP) effluents across the world because WWTPs are unable to completely remove these compounds and their by-products (Heberer, 2002; Kolpin et al., 2002; Rosal et al., 2010). These drugs reach WWTP mainly as the result of human excretion and/or disposal of unused medication and are released to the aquatic environments in metabolised and/or un-metabolised forms via WWTP discharges (Diniz et al., 2015).

Proton pump inhibitors (PPIs) are one group of the most commonly used pharmaceuticals worldwide. PPIs act by irreversibly blocking the terminal stage of gastric acid secretion in the gut, inhibiting the gastric proton pump  $H^+/K^+ATPase$  in parietal cells, so it decreases the amount of acid produced in the stomach (Horn, 2000; Vesper et al., 2009; Sterbini et al., 2016). Omeprazole (OMP) belongs to this group of pharmaceuticals and it is used for the treatment of gastro-intestinal disorders such as dyspepsia, peptic ulcer, gastroesophageal reflux disease or *Helicobacter pylori* infection (Kosma et al., 2016). OMP was the most consumed drug in Spain in 2015 according to the annual report of the National Health System (Spanish Ministry of Health, Social Services and Equality, 2015). Because of its high worldwide consumption and its high excretion rates in human bodies, this compound might have high potential to reach the environment (Jain et al., 2007). However, recorded environmental levels of OMP are usually low in waters (in the range of  $ng L^{-1}$  and  $\mu g L^{-1}$ ) (Kosma et al., 2016). Its occurrence is reported in some studies with concentrations ranging from  $2134 ng L^{-1}$  to  $57 ng L^{-1}$  in influent wastewaters and from  $922 ng L^{-1}$  to below quantification limit ( $< LOQ$ ) in effluent wastewaters (Rosal et al., 2010). Low concentrations detected could be mainly due to its degradation or transformation, since human urinary metabolites and transformation products formed through abiotic processes when this compound reaches the aquatic environment (i.e. biodegradation,

\* Corresponding author.

E-mail address: [angeles.cid@udc.es](mailto:angeles.cid@udc.es) (Á. Cid).<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.001>

Received 11 April 2017; Received in revised form 19 June 2017; Accepted 1 August 2017

Available online 02 August 2017

0166-445X/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

hydrolysis or photodegradation) have been recently documented (DellaGreca et al., 2006; Besse et al., 2008; Ortiz de García et al., 2013; Boix et al., 2014; Kosma et al., 2017). But transformation products formed can be either more persistent or toxic than the parent compound (DellaGreca et al., 2003; Isidori et al., 2005; Diniz et al., 2015).

Microalgae are frequently used in ecotoxicological screening of contaminated water, and also as test microorganisms for *in vitro* toxicity bioassays due to their ecological relevance and sensitivity. Several studies about the effects of pharmaceuticals in aquatic organisms showed that algae were, generally, the most sensitive species (Halling-Sørensen et al., 1998; Webb, 2001; Sanderson and Thomsen, 2009). These organisms are primary producers and the base of the aquatic food webs; therefore, any effect on them could affect higher trophic levels (Campanella et al., 2001; Rioboo et al., 2007). Because of their short generation times, microalgae respond rapidly to environmental changes and often provide one of the first signals of ecosystem impacts (McCormick and Cairns, 1994). Studies with microalgae as test organisms have demonstrated that flow cytometry (FCM) is a convenient technique to assess the toxic effects of different pollutants in these organisms (Cid et al., 1996; Adler et al., 2007; Jamers et al., 2009; Rioboo et al., 2009; Prado et al., 2015, 2012; Esperanza et al., 2015a) since it allows a rapid, quantitative and simultaneous measurement of multiple responses to toxic stress in individual algal cells near *in vivo* conditions (Shapiro, 1995).

The aim of the present study was to evaluate the potential acute toxicity of OMP, a widely used pharmaceutically active compound, on the marine microalga *Tetraselmis suecica*. This species is easy to culture, has a short generation time and it showed sensitivity to different contaminants, including antibiotics or personal care products (Seoane et al., 2014; Seoane et al., 2017). In addition to the traditional growth endpoint and the spectrophotometric method for the quantification of chlorophyll *a*, several physiological and biochemical parameters previously analysed and described as early potential markers of cytotoxicity in microalgae (Prado et al., 2012), such as cell volume, intracellular complexity, chlorophyll *a* fluorescence, reactive oxygen species (ROS) production, cell viability, metabolic activity, cytoplasmic and mitochondrial membrane potential and intracellular pH were monitored by flow cytometry (FCM) after only 24 h of exposure to different concentrations of OMP. After this exposure time, an entire 12:12 h light:dark cycle was completed and it has been found that, in such a short time period, microalgae experienced metabolic adjustments in response to contaminants (Esperanza et al., 2015b).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microalgal cultures and test chemical

*T. suecica* (Kylin) Butch (*Prasynophyceae*) was cultured in filtered (pore size: 0.20 µm) and autoclaved seawater enriched with Algal-1 medium (Herrero et al., 1991) under controlled conditions: 18 ± 1 °C, illuminated with a photon flux of approximately 70 µmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, under a dark:light cycle of 12:12 h. For the toxicity bioassays, batch cultures were carried out in Kimax glass tubes containing 40 mL of culture. Microalgal cells in early exponential growth phase were used as inoculum for the different assays and initial cell density was adjusted to 5 × 10<sup>4</sup> cells mL<sup>-1</sup>.

OMP concentrations tested (80, 100, 120 and 140 mg L<sup>-1</sup>) were chosen taking into account the obtained EC<sub>50</sub> value for growth and were expressed as cellular quota (1.60, 2.00, 2.40 and 2.80 ng cell<sup>-1</sup>). Before each experiment, OMP stock solutions were prepared dissolving the pure compound (Fluka, MW: 345.42) in methanol. Then, these solutions were diluted in order to add the same amount of methanol to all samples and to reach the final tested concentrations indicated above. To achieve these nominal concentrations, stock solutions volume added to the microalgal cultures never exceed 0.05% of final culture volume. A statistical comparison between 0.05% methanol controls and controls

without this solvent revealed no significant difference in algal growth (*t* – test; *p* – value > 0.05), and all subsequent tests were performed using only the solvent control. No significant differences between nominal and effective concentrations of OMP were found using a high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) analysis. The contaminants were added to the cultures during the first hour of light to ensure that an entire light:dark cycle was completed before the analyses. All cultures were carried out in triplicate and cultures without tested chemical were included as controls. Since a change in the pH of the culture could modify the toxicity of OMP or alter the growth of the microalga, it was ensured that pH did not change significantly by daily measurements.

### 2.2. Growth measurement

After 24 h of culture, cell density was determined by counting culture aliquots of the different treatments in the flow cytometer using a suspension of fluorescent polystyrene microspheres (Flow-Count Fluorospheres; Beckman Coulter Inc.) with a known concentration for its calibration. Growth rates (µ) (expressed as day<sup>-1</sup>) were calculated using the classical equation:

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

where *N<sub>t</sub>* is the cell density at time *t* and *N<sub>0</sub>* is the cell density at time 0.

In addition, toxicity was expressed as effective concentrations and EC<sub>10</sub> and EC<sub>50</sub> values at 24 h were calculated.

### 2.3. Chlorophyll *a* determination

Chlorophyll was extracted in the dark at 4 °C during 24 h from a concentrated microalgal sample in a 90% acetone aqueous solution and determined by measuring the absorbance of the extract using a Shimadzu UV-1700 spectrophotometer at appropriate wavelengths. The resulting absorbance measurements were translated to chlorophyll *a* content according to the following equation (Jeffrey and Humphrey, 1975):

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

where Chlorophyll *a* represents the concentration in µg mL<sup>-1</sup> in the extract; *A<sub>664</sub>* and *A<sub>647</sub>* are the absorbances read at 664 and 647 nm respectively. Results were then expressed as pg of chlorophyll *a* per cell.

### 2.4. Flow cytometric analyses

Flow cytometric (FCM) analyses of *T. suecica* cells were performed on a Beckman-Coulter Gallios flow cytometer equipped with an argon-ion excitation laser (488 nm), detectors of forward (FS) and side (SS) light scatter and four fluorescence detectors corresponding to different wavelength intervals: 505–550 nm (FL1), 550–600 nm (FL2), 600–645 nm (FL3) and > 645 nm (FL4).

Some parameters analysed by FCM were inherent cell properties, while other physiological parameters were determined using different functional fluorochromes. Prior to the investigation, extensive experiments were conducted to optimize probes concentrations and incubation conditions in order to obtain significant, time-stable and non-toxic staining of cells.

Forward scatter (related to cell volume) and FL4 channel (red chlorophyll fluorescence) dot-plots were used to characterize the microalgal population and cells were gated based on these two parameters in order to exclude non-microalgal particles for the analyses. For each cytometric parameter investigated, at least 10<sup>4</sup> gated cells per sample were collected. Data were collected using listmode files and analysed using the Kaluza software version 1.1 (Beckman Coulter Inc.).

#### 2.4.1. Relative cell size, intracellular complexity and chlorophyll *a* fluorescence

Forward light scatter (FS) is related to cell size, or volume, and FS intensity increases with the increase of cell cross-sectional area. Side light scatter (SS) is related to intracellular complexity and SS intensity increases with the increase in granularity (Shapiro, 1995). *T. suecica* presents also natural autofluorescence due to the presence of chlorophyll *a* and other accessory pigments. Red chlorophyll *a* fluorescence was detected in the FL4 channel. Aliquots of each microalgal culture were analysed by FCM to study potential alterations on these inherent cell properties. Fluorescence measurements were obtained in a logarithmic scale and data were compiled as the mean fluorescence value of the cell population in arbitrary units (a. u.). Since differences in cellular volume mean values between treated and control cells were observed, most of the other parameters analysed were corrected by the FS signal.

#### 2.4.2. Oxidative stress: determination of intracellular levels of reactive oxygen species (ROS)

Oxidative stress was evaluated based on FCM determinations of intracellular levels of superoxide anion radical ( $O_2^-$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), using the fluorochromes hydroethidine (HE) and dihydrorhodamine 123 (DHR123), respectively.

Hydroethidine (HE) or dihydroethidium can enter the cell where it is selectively oxidised by superoxides (Benov et al., 1998) to form a DNA-binding fluorophore, giving a fluorescence signal, with a maximum emission at 605 nm, which can be collected in the FL3 detector. *T. suecica* cells were incubated with  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  of HE for 30 min following the protocol previously described by Prado et al. (2012) adapted to *T. suecica*. Results are expressed as percentage of HE+ cells, considered cells with high intracellular  $O_2^-$  levels.

Dihydrorhodamine 123 (DHR123) was shown to be specifically responsive to  $H_2O_2$  (Qin et al., 2008). This dye passively diffuses across cell membranes and, once inside the cell, it can be oxidised, mainly by  $H_2O_2$ , to form cationic rhodamine 123 (Dikshit and Sharma 2001). This is a fluorescent compound which localises in the mitochondria emitting a bright fluorescent signal with a maximum emission at 529 nm, which can be collected by the FL1 detector. *T. suecica* cells were incubated with  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  of DHR123 for 40 min following the protocol previously described by Prado et al. (2012) adapted to *T. suecica*. Results are expressed as the mean fluorescence value of the cell population. For both fluorochromes, staining protocol was validated incubating stained cells with  $H_2O_2$  at a final concentration of 5 mM for 10 min as a positive control.

#### 2.4.3. Cell viability

Membrane integrity was assessed by propidium iodide (PI) permeability bioassay. PI was used to discriminate between viable non-fluorescent microalgal cells (PI-) and non-viable fluorescent cells with damaged or disrupted cell membranes (PI+) (Cid et al., 1996). *T. suecica* cells were incubated with  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  of PI for 10 min as previously described by Seoane et al. (2014). Orange PI fluorescent emission was collected in the FL3 detector and obtained in a logarithmic scale. Data were expressed as the percentage of viable cells (PI-) vs. the total amount of cells analysed. Heat-treated cells were included as a positive control.

#### 2.4.4. Metabolic activity

Metabolic activity was studied using the fluorescein diacetate (FDA) cytometric assay, a rapid and sensitive technique to assess microalgal esterase activity (Jochem, 1999). FDA staining has been widely used as a method to assess viability in phytoplankton exposed to cytotoxic conditions (Lage et al., 2001; Prado et al., 2011). After entering the cell, its acetate residues are cleaved off by non-specific esterases and the polar hydrophilic fluorescent product fluorescein is retained by cells with intact plasma membranes. In this way, cells with altered membranes rapidly leak the dye, even if they retain some residual esterase activity, and remain

non-fluorescent. Furthermore, in the present study this assay was used to assess the metabolic vigour of viable and metabolically active cells by means of the fluorescein fluorescence intensity generated, indicative of the cellular metabolic activity level. Thereby, FDA can be used to discriminate between metabolically non-active cells, which included non-viable cells (FDA-), and metabolically active cells (FDA+).

*T. suecica* cells were incubated with  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  of FDA for 15 min as previously described by Seoane et al. (2014). Green fluorescein fluorescence was detected in the FL1 channel and obtained in a logarithmic scale. Results are expressed as percentage of metabolically non-active cells (FDA-) and metabolically active cell (FDA+) and also as the mean fluorescence values of FDA+ cells. Heat-treated cells were included as a positive control.

#### 2.4.5. Cytoplasmic membrane potential

Alterations on cytoplasmic membrane potential were studied using a slow-response potentiometric probe, the bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (DiBAC<sub>4</sub>(3)). DiBAC<sub>4</sub>(3) can enter depolarized cells where it binds to intracellular proteins or membranes (Wolff et al., 2003). Increased depolarization of cell membranes results in additional influx of the anionic dye and an increase in fluorescence. Conversely, hyperpolarization is indicated by a decrease in fluorescence (Rabinovitch and June, 1990). *T. suecica* cells were incubated with  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  of DiBAC<sub>4</sub>(3) for 10 min following the protocol previously described by Seoane et al. (2017). DiBAC<sub>4</sub>(3) green fluorescent emission was collected in the FL1 channel and obtained in a logarithmic scale. Data were collected as the mean fluorescence value of the cell population.

#### 2.4.6. Mitochondrial membrane potential

Changes in mitochondrial membrane potential were evaluated using the lipophilic cationic probe 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazole-dazolylcarbocyanine iodide (JC-1). JC-1 is a ratiometric, dual emission potential-sensitive probe that accumulates in mitochondria. JC-1 exists as a monomer at low concentrations and yields green fluorescence, but at higher concentrations, this dye forms J-aggregates that exhibit orange fluorescence. *T. suecica* cells were incubated with  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  of JC-1 for 15 min following the protocol previously described by Prado et al. (2012) adapted to *T. suecica*. The fluorescence intensities of both green (JC-1 monomers) and orange (JC-1 oligomers) were recorded by the FL1 and FL3 detectors, respectively and results were expressed as the orange (JC-1 oligomers)/green (JC-1 monomers) fluorescence intensity ratio, which is dependent only on the mitochondrial membrane potential (Cassart et al., 2007). This ratio was calculated directly during data acquisition by the cytometer data analysis system, and presented on a linear 1024-channel histogram. Results are expressed as the mean fluorescence value of the cell population.

#### 2.4.7. Intracellular pH (pH<sub>i</sub>)

Changes in pH<sub>i</sub> were evaluated using the non-fluorescent and cell-permeant acetoxyethyl ester form of the fluorochrome 20,70-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF AM). BCECF AM diffuses through the cell membrane and intracellular esterases cleave the ester bond releasing BCECF, which fluoresces according to the pH<sub>i</sub>. BCECF is a dual-emission ratiometric pH indicator that, when excited by blue light, emits pH-dependent orange fluorescence and non-pH-dependent green fluorescence. Therefore, the green/orange fluorescence ratio was used to analyse pH<sub>i</sub> (Franck et al., 1996; Gibbin and Davy, 2013). This ratiometric method allowed to correct differences in fluorochrome uptake and cell size. *T. suecica* cells were incubated with  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  of BCECF for 40 min following the protocol previously described by Prado et al. (2012) adapted to *T. suecica*. The green and orange fluorescences were collected by the FL1 and FL3 detectors, respectively. The ratio of the two signals was calculated directly during data acquisition by the cytometer data analysis system, and presented on a linear 1024-channel histogram. Results are expressed as the mean fluorescence value of the cell population.

### 2.5. Statistical analysis of results

EC<sub>50</sub> values for growth at 24 h were calculated using the computer program CompuSyn (Chou and Martin, 2005). For the FGM data analysis, mean and standard deviation (SD) of the fluorescence values of the three biological replicates were determined for each treatment and for control cultures. Data were checked for homogeneity of variance (Levene test) and then were statistically analysed by an overall one-way analysis of variance (ANOVA) using IBM SPSS Statistics software 21.0. A  $p$  – value < 0.05 was considered statistically significant. When significant differences were observed, control vs. treated means were compared using the Dunnett *post hoc* test ( $p$  < 0.05).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Growth, chlorophyll *a* content and inherent cell properties

Growth data indicated that OMP treatment induced a significant ( $p$  < 0.05) inhibitory effect on *T. suecica* proliferation in a concentration-dependent manner, which resulted in lower growth rates in cultures exposed to all OMP concentration assayed with respect to control cultures (Table 1). The growth rate in cultures exposed to the highest OMP concentration assayed was three times lower than in control cultures (0.44 and 1.33 day<sup>-1</sup>, respectively). Taking into account these data, the EC<sub>10</sub> value at 24 h was 0.94 ± 0.04 ng cell<sup>-1</sup> (which corresponds to 46.77 ± 1.98 mg L<sup>-1</sup>) and the EC<sub>50</sub> value was 2.28 ± 0.13 ng cell<sup>-1</sup> (which corresponds to 114.05 ± 6.46 mg L<sup>-1</sup>).

Concentrations of OMP in the environment do not usually reach the assayed concentrations and microalgal cell density in these bioassays is also much higher than in the environment. Therefore, concentrations tested were expressed as cellular quota (mass of chemical substance per cell) as it is more appropriate in this type of studies. This expression tries to be an approach to a better unification of literature data by eliminating the effect of cellular density. It provides an easier way to standardize protocols through the use of a single expression containing the values for contaminant concentration and cell density, the two main factors studied in marine toxicity tests. Values which consider the contaminant that corresponds to each organism in terms of cellular content are expected to be more useful than concentrations per volume of water as it has been previously published by several authors (Moreno-Garrido et al., 2000; Debelius et al., 2009; Seoane et al., 2017).

There are not many references in the scientific literature about ecotoxicological effects of pharmaceuticals on non-target aquatic organisms, and less concerning OMP. For *Daphnia magna*, the 48 h EC<sub>50</sub> value for OMP was 88 mg L<sup>-1</sup> (Sanderson and Thomsen, 2009). Toxicity of OMP on *Vibrio fischeri* photobacteria was also determined (Ortiz de García et al., 2014), obtaining an EC<sub>50</sub> value of 1.76 mg L<sup>-1</sup> based on a 15 min bioluminescence inhibition test. Consequently, this compound can be classified as toxic to aquatic organism based on the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (United Nations, 2011).

**Table 1**  
Effect of different concentrations (ng cell<sup>-1</sup>) of omeprazole on growth and chlorophyll *a* content (pg cell<sup>-1</sup>) of *T. suecica* cells after 24 h of exposure. Data are given as mean values ± standard deviation of three replicates. Significant differences with respect to control at a level of significance of 0.05 ( $p$  < 0.05) are represented by an asterisk (\*).

Omeprazole (ng cell <sup>-1</sup> )	Cell density (cells x 10 <sup>4</sup> mL <sup>-1</sup> )	Growth rate μ (day <sup>-1</sup> )	Chlorophyll <i>a</i> (pg cell <sup>-1</sup> )
Control	13.07 ± 0.34	1.33 ± 0.04	1.79 ± 0.27
1.60	9.73 ± 0.21 *	0.90 ± 0.03 *	1.17 ± 0.24 *
2.00	9.03 ± 0.25 *	0.80 ± 0.04 *	1.25 ± 0.13 *
2.40	8.37 ± 0.41 *	0.68 ± 0.07 *	1.36 ± 0.28 *
2.80	7.07 ± 0.29 *	0.44 ± 0.06 *	1.33 ± 0.20 *

**Table 2**

Effect of different concentrations (ng cell<sup>-1</sup>) of omeprazole on inherent cell properties of *T. suecica* after 24 h of exposure. Data are given as mean fluorescence values ± standard deviation of three replicates. Significant differences with respect to control at a level of significance of 0.05 ( $p$  < 0.05) are represented by an asterisk (\*).

Omeprazole (ng cell <sup>-1</sup> )	Relative cell size FS (a.u.)	Intracellular complexity SS (a.u.)	Corrected autofluorescence FL4/FS (a.u.)
Control	450.00 ± 10.20	577.73 ± 6.34	3.08 ± 0.07
1.60	525.33 ± 6.02 *	589.53 ± 14.89 *	2.75 ± 0.06 *
2.00	535.67 ± 3.40 *	632.50 ± 8.76 *	2.77 ± 0.06 *
2.40	532.00 ± 1.02 *	637.07 ± 18.13 *	2.82 ± 0.02 *
2.80	542.50 ± 6.50 *	765.17 ± 20.55 *	2.80 ± 0.01 *

Regarding chlorophyll *a* content, a significant ( $p$  < 0.05) decrease was also observed in all cultures exposed to OMP with respect to control cultures (Table 1). Several studies have shown that pharmaceuticals can strongly inhibit the synthesis of chlorophyll (Zhang et al., 2012; Tsiaka et al., 2013). Concerning inherent cell properties, all OMP concentrations assayed caused a slight but significant increase in cell volume and a significant increase in their intracellular complexity (Table 2). One critical point in the regulation of the cell cycle is to coordinate the cell volume growth and the division process in order to maintain cell size (Oldenhof et al., 2004; Rioboo et al., 2009). Microalgal cells increased in size until they became large enough for completing cell cycle and dividing. Cells cultured in the presence of OMP showed a significant ( $p$  < 0.05) enhancement of the FS signal, related to an increase in cell volume, that could be due to the incapacity to finish cell division as evidenced by growth data (Table 1). Before dividing, cells enlarged because of the increase in cellular constituents; this active metabolism is also reflected by the significant ( $p$  < 0.05) increase in cellular complexity or SS signal (Table 2).

To avoid variability of data due to differences in cell volume, chlorophyll *a* fluorescence was corrected by cell size using the FS signal. Corrected autofluorescence data decreased significantly ( $p$  < 0.05) in all OMP exposed cultures with respect to control ones (Table 2). Similar results were obtained with *T. suecica* cells exposed to triclosan (Seoane et al., 2017), since cells exposed to this disinfectant experienced an increase in size and a decrease in autofluorescence. Furthermore, different microalgal cells exposed to copper showed similar results (Franklin et al., 2001). Chlorophyll *a* fluorescence is a function of the cell pigment content and the photochemical activity of PSII in the photosynthetic electron transport chain. Therefore, this autofluorescence reduction could be due to the decrease in pigment content observed (Table 1) or to oxidative damage to PSII. It is probable that the reduction of the autofluorescence detected was related to an oxidative breakdown of chlorophyll as a consequence of the generation of ROS (Ekmekci and Terzioglu, 2005a, 2005b).

### 3.2. Oxidative stress: ROS production

Exposure to OMP caused a remarkable increase in oxidative stress in treated cultures with respect to the control ones, resulting in a substantial raise in the population of cells with high intracellular ROS levels (O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Figs. 1 and 2). Cultures exposed to the two highest OMP concentrations tested (2.40 and 2.80 ng cell<sup>-1</sup>) showed a subpopulation with significant ( $p$  < 0.05) higher intracellular levels of O<sub>2</sub><sup>-</sup> (HE +). The percentages of these subpopulations were 3.12 and 12.65%, respectively, of the total amount of cells analysed (Fig. 1D, E). However, in the two lowest concentrations tested (1.60 and 2.00 ng cell<sup>-1</sup>), no significant ( $p$  < 0.05) differences were observed with respect to the control (Fig. 1A, B, C).

Intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels were also significantly ( $p$  < 0.05) increased in all cultures exposed to OMP even at the lowest concentration assayed (1.60 ng cell<sup>-1</sup>). After only 24 h of exposure, these cultures



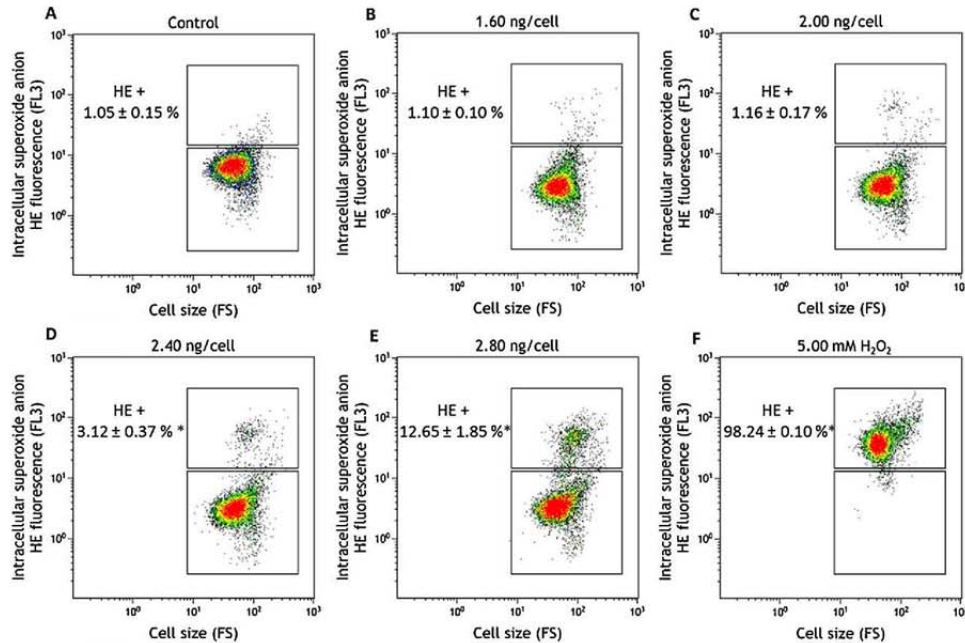


Fig. 1. Biparametric histograms showing the intracellular levels of superoxide anion in control cultures (A) and in cultures exposed to 1.60 (B), 2.00 (C), 2.40 (D) and 2.80 (E)  $\text{ng cell}^{-1}$  of omeprazole for 24 h vs. relative cell size. Cells treated with 5 mM of  $\text{H}_2\text{O}_2$  were used as a positive control (F). The regions correspond to each subpopulation differentiated. Percentages of HE+ cells (considered cells with higher intracellular  $\text{O}_2^-$  levels) were provided. Data are given as mean  $\pm$  standard deviation of three replicates. Significant differences with respect to control at a level of significance of 0.05 ( $p < 0.05$ ) are represented by an asterisk (\*).

exhibited a drastic increase of the green DHR 123-derived fluorescence, which means a dramatic raise of the intracellular hydrogen peroxide levels (Fig. 2).

In photosynthetic organisms, including microalgae, ROS are continuously produced in chloroplasts and mitochondria as byproducts from various pathways of the oxygen-based metabolism (Halliwell, 2006). However, microalgae may have higher levels of ROS as a result of environmental conditions and the presence of contaminants. As ROS can be highly toxic molecules, their levels must be tightly regulated by antioxidant protective mechanisms to avoid damage to cell components (van Creveld et al., 2014). In this case, the possible microalgal defence mechanisms against oxidative stress were not able to regulate the overproduction of ROS induced by OMP, particularly, the overproduction of hydrogen peroxide.

This oxidative stress could be related to the decrease in the corrected chlorophyll *a* fluorescence indicated before (Table 2) due to oxidative damage to PSII or to chlorophyll bleaching as a consequence of the production of ROS (Ekmekci and Terzioğlu, 2005a, 2005b). The photosynthetic efficiency decrease produced by the pollutant could, in turn, enhance ROS production in microalgal cells causing oxidative damages and function abnormalities (Liu et al., 2012). The overproduction of ROS detected could also explain the increase in intracellular complexity observed in cultures exposed to OMP (Table 2) due to a degradation and disorganisation of cell organelles as a result of the interaction of these highly toxic agents with unsaturated lipids of membranes (Bray et al., 1993; Suntres, 2002).

ROS are classically considered toxic metabolic byproducts that ultimately lead to cell death and plant cells have mechanisms to combat increased ROS levels during abiotic stress conditions. However, it is now recognized that ROS act as central secondary messengers that regulate signalling networks (D'Autréaux and Toledano, 2007). This

function suggests that cells have evolved strategies to use ROS as biological signals that control various genetic stress programs, as has been seen for diatoms (Rosenwasser et al., 2014). Plant cells also appear to purposefully generate ROS as signalling molecules to control programmed cell death (Apel and Hirt, 2004).

### 3.3. Cell viability

After 24 h the percentage of viable *T. suecica* cells with intact plasma membrane (PI-) significantly ( $p < 0.05$ ) decrease in cultures exposed to all OMP concentrations assayed, except the lowest one ( $1.60 \text{ ng cell}^{-1}$ ) (Fig. 3). In cultures exposed to  $2.60 \text{ ng cell}^{-1}$  the percentage of PI- cells fell to 93.3% and a small subpopulation of non-viable cells can be clearly differentiated (Fig. 3E).

Cell viability results could also explain the increase in intracellular complexity observed (Table 2), because cells that undergo apoptosis often show a higher SS signal than nonapoptotic cells (Darzynkiewicz et al., 1997). The generation of ROS discussed before (Figs. 1, 2) could also be implicated in the initiation of membrane damaging by the induction of lipid peroxidation, lysis or fatty acid de-esterification (Cid et al., 1996). When a certain threshold of ROS production has been surpassed, the cellular antioxidant defence mechanisms are no longer able to respond sufficiently and oxidative stress leads to membrane disruption and ultimately cell death (Hess, 2000; Esperanza et al., 2015a). Intracellular  $\text{O}_2^-$  levels detected could be related with results of cell viability. In cultures with low  $\text{O}_2^-$  levels ( $1.60$  and  $2.00 \text{ ng cell}^{-1}$ ) the percentage of viable cells (PI-) remained close to 100% and in cultures with a significant ( $p < 0.05$ ) percentage of cells with high  $\text{O}_2^-$  levels ( $2.40$  and  $2.80 \text{ ng cell}^{-1}$ ) a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in viability was detected (Fig. 1, 3).

Despite the large amount of ROS produced in all OMP-treated

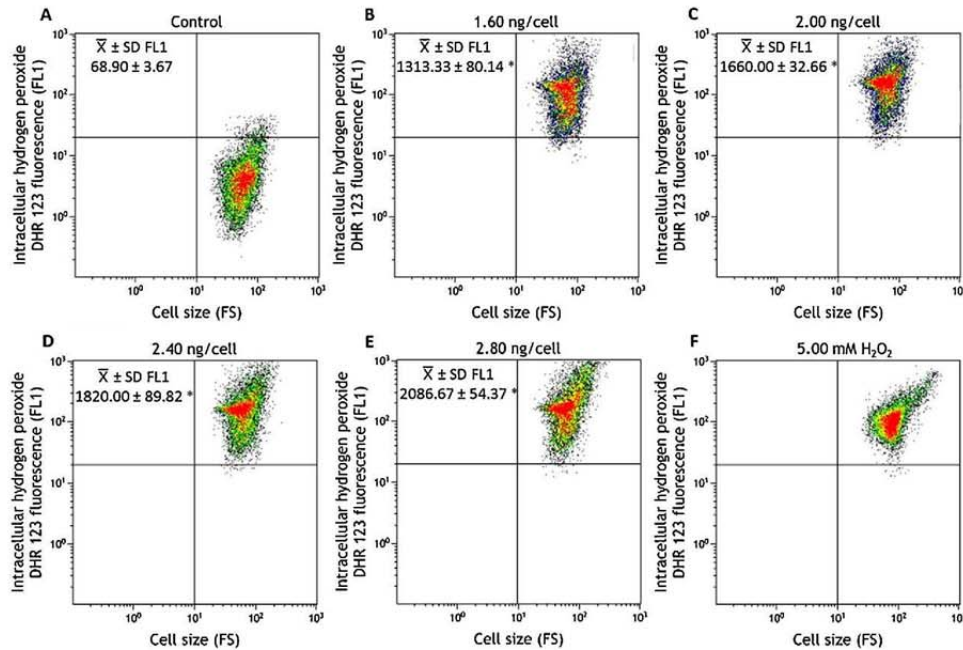


Fig. 2. Biparametric histograms showing the intracellular levels of hydrogen peroxide in control cultures (A) and in cultures exposed to 1.60 (B), 2.00 (C), 2.40 (D) and 2.80 (E) ng cell<sup>-1</sup> of omeprazole for 24 h vs. relative cell size. Cells treated with 5 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were used as a positive control (F). The mean fluorescence value  $\pm$  standard deviation of three replicates was provided for each concentration and for the control. Significant differences with respect to control at a level of significance of 0.05 ( $p < 0.05$ ) are represented by an asterisk (\*).

cultures (Fig. 1, 2), especially H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, only those exposed to the highest concentrations tested showed a meaning but small percentage of non-viable cells of about 7% (Fig. 3E). A potential explanation could be the stimulation of antioxidant defence mechanisms, as reported before for other green algae (Dewez et al., 2005; Chankova et al., 2014), or the dependence on exposure time (Esperanza et al., 2015b) since only short-term effects (24 h) were assessed.

#### 3.4. Metabolic activity

The percentage of metabolically non-active cells (FDA-) significantly ( $p < 0.05$ ) increased in cultures exposed 24 h to OMP with respect to control cultures in a concentration-dependent manner (Fig. 4). Metabolically active population (FDA+ cells) was significantly ( $p < 0.05$ ) reduced in cultures exposed to the highest OMP concentrations assayed (2.40 and 2.80 ng cell<sup>-1</sup>) and the percentage of the FDA- population in these cultures was 4.19 and 6.12%, respectively (Fig. 4D, E). These data correlate well with the results of cell viability since in cultures exposed to the highest concentration assayed a population of about 7% of non-viable cells could be distinguished (Fig. 3E). Cells that have lost their plasma membrane integrity and have become permeable to external compounds, such as dyes and enzymes, are considered to be non-viable and they are not metabolically active (Cid et al., 1997).

However, regarding the activity level of the metabolically active population (FDA +), cultures exposed to OMP showed a higher activity level reflected by an increase in the fluorescein fluorescence intensity in comparison with control cultures (Fig. 5). This stimulation of enzyme activity may be a result of a general metabolic stimulation induced by the toxic agent in microalgal cells in order to adapt their physiology to adverse environmental conditions as has already been reported in *T. suecica* cells exposed to the UV filter benzophenone-3

(Seoane et al., 2017) and in other microalgal species exposed to paraquat or copper (Lage et al., 2001; Prado et al., 2009). Furthermore, the clear increase in the mean fluorescein fluorescence intensity observed might be related to the activation and upregulation of detoxification processes, in which esterases may take part, due to the overproduction of ROS detected (Figs. 1,2) (Szivak et al., 2009). It was also observed for other phytoplankton species exposed to metals and a type of polyphenol (Jammers et al., 2009; Jammers et al. 2013; Eigemann et al., 2013).

Enzyme inhibition measurements in microalgae are popular indicators of environmental stress. The FDA assay has been reported as being not only helpful to discriminate between “healthy” and “stressed” cells, but also to quantify subtle responses to environmental impacts. Furthermore, the advantage of cytometric measurements over fluorescence microscopy or bulk estimates by fluorometry lies in the assessment of minor changes in metabolic activity by the detection of changes in the fluorescence intensity exhibited on a single-cell basis (Jochem, 1999).

#### 3.5. Cytoplasmic and mitochondrial membrane potentials

FCM analysis of DiBAC<sub>4</sub>(3)-stained cells showed that OMP altered the cytoplasmic membrane potential of *T. suecica*. The influx of the fluorochrome into the cells was reduced in cultures exposed to all concentrations of OMP; therefore, these cells exhibited a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in the green fluorescence emission with respect to control cultures indicating cell hyperpolarization (Fig. 6A). Fluorochrome-based measurements of plasma membrane potential provide a useful approach for the monitoring of cellular stress in *T. suecica* as it has been previously shown with other contaminants (Seoane et al., 2017) and for other organisms and other microalgal species (Mason et al., 1994; Dinsdale et al., 1995; Lloyd et al., 2004; Prado et al., 2012). Microbial plasma membrane is the chemiosmotic barrier that provides

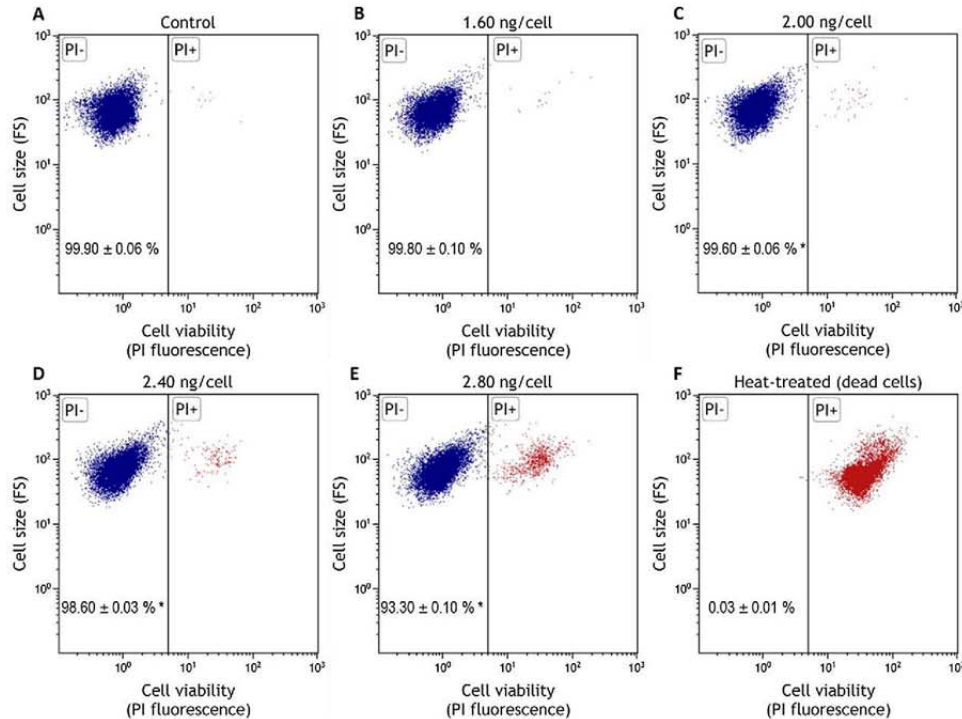


Fig. 3. Cell viability of *T. suecica* cells in control cultures (A) and in cultures exposed to 1.60 (B), 2.00 (C), 2.40 (D) and 2.80 (E) ng cell<sup>-1</sup> of omeprazole for 24 h. Heat-treated cells were included as a positive control (F). Percentages of viable cells with intact plasma membrane (PI-) were provided. Data are given as mean  $\pm$  standard deviation of three replicates. Significant differences with respect to control at a level of significance of 0.05 ( $p < 0.05$ ) are represented by an asterisk (\*).

the interface between the organism and its external environment; therefore, cytoplasmic membrane potential reports on the current transport and energy status of the cell (Konrad and Hedrich, 2008). The alterations observed in the membrane permeability properties could lead to osmotic changes and failures in the regulatory cell volume control process, which, in turn, explain the increase in cell size observed in these cells (Table 2).

In plant cells, the cytoplasmic membrane potential is created by the asymmetric transport of protons (H<sup>+</sup>) due to the activity of primary pumps like ATPases (Palmgren et al., 2003). These pumps extrude H<sup>+</sup> towards the outside of the cell, in the case of those located in the plasma membrane (P-ATPases), or transport H<sup>+</sup> towards the lumen of the vacuole, in the case of those present in the tonoplast (V-ATPases) (Pedersen, 2007). They are usually coupled in parallel to anionic channels or in antiparallel to K<sup>+</sup> channels, to avoid intracellular hyperpolarization (Hilden et al., 1988). Ion transport will affect charge distribution across the membrane and, hence, its voltage. Therefore, the alterations observed on the cytoplasmic membrane potential of *T. suecica* cells exposed to the pharmaceutical could be due to the mechanism of action of OMP, which inhibits ATPases, affecting proton pumps of non-target microalgae.

*T. suecica* cells were also stained with the mitochondria-specific dye JC-1, widely used to monitor mitochondrial membrane potential. Cells exposed to the highest OMP concentrations (2.40 and 2.80 ng cell<sup>-1</sup>) showed a significantly ( $p < 0.05$ ) higher orange (JC-1 oligomers)/green (JC-1 monomers) fluorescence ratio values than control cells, indicating mitochondrial membrane hyperpolarization (Fig. 6B). Fluorescent dyes for measuring the mitochondrial membrane potential have also become

commonly used tools for monitoring changes in this important physiological mitochondrial parameter as it relates well to the capacity of cells to generate ATP by oxidative phosphorylation (Perry et al., 2011). During aerobic respiration, the movement of electrons along the respiratory chain generates an electrochemical force consisting of a hyperpolarized transmembrane voltage (negative inside) and a proton concentration gradient (alkali inside) across the inner mitochondrial membrane. Protons move down this electrochemical gradient through ATP synthase to generate ATP. Observed changes in mitochondrial membrane potential may also be due to the mechanism of action of OMP. This pharmaceutical could affect proton pumps such as F-ATPases of non-target microalgae. F-ATPases, found in the inner membranes of mitochondria, are the prime enzymes used for ATP synthesis and are remarkably conserved throughout evolution (Pedersen, 2007).

During cellular stress, mitochondrial membrane potential may be altered by deregulation of intracellular ionic charges and, when ionic fluxes surpass the ability of mitochondria to buffer these changes, these potentials or gradients may collapse, leading to a failure of ATP production and to bioenergetic stress (Perry et al., 2011). Thus, the magnitude of this potential and its regulation are key determinants of health, disease and ageing (Green et al., 2004; Nicholls, 2004).

Obtained results could also explain the high levels of ROS produced in OMP-exposed cells because the rate of ROS emission by the electron transport chain rises exponentially at strongly polarized mitochondrial membrane potential (Gerencser et al., 2012). Additionally, a strong correlation between the mitochondrial glutathione redox potential and subsequent induction of cell death was found on the marine diatom *P. tricornutum* (van Creveld et al., 2014). Other studies have also shown

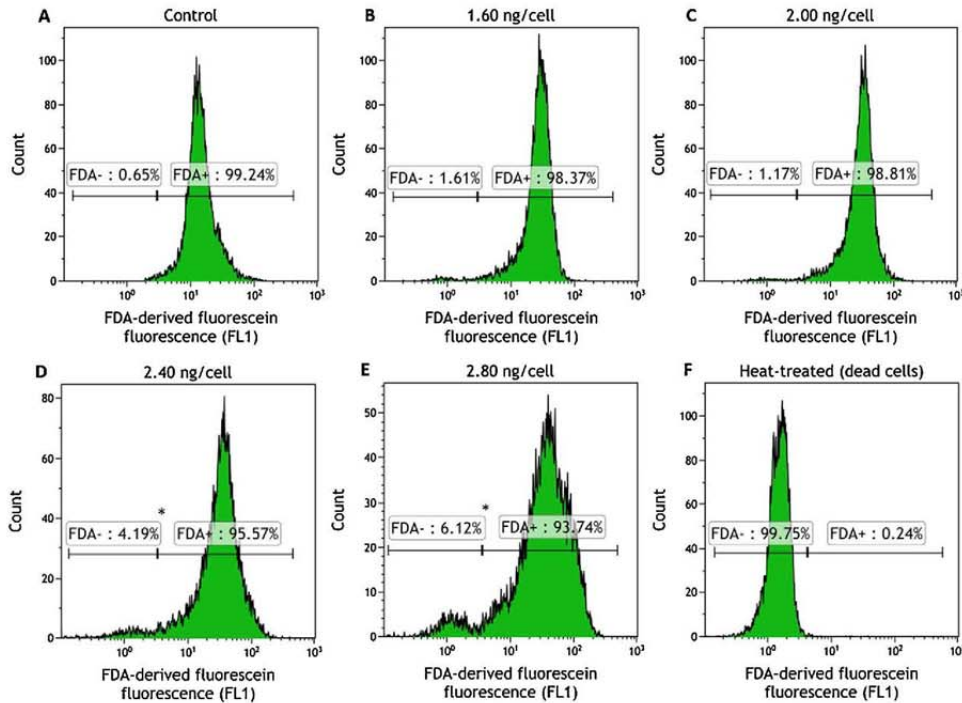


Fig. 4. Flow cytometric histograms showing the metabolic activity of *T. suecica* cells in control cultures (A) and in cultures exposed to 1.60 (B), 2.00 (C), 2.40 (D) and 2.80 (E) ng cell<sup>-1</sup> of omeprazole for 24 h. Heat-treated cells were included as a positive control (F). Percentage of metabolically non-active cells (FDA-) and metabolically active cells (FDA+) were provided. Significant differences with respect to control at a level of significance of 0.05 ( $p < 0.05$ ) are represented by an asterisk (\*).

that mitochondrial membrane hyperpolarization is an early event on the induced mitochondrial-mediated apoptosis on different cell types (Gergely et al., 2002; Giovannini et al., 2002; Leal et al., 2015). In this study, the highest OMP concentrations tested caused a significant ( $p < 0.05$ ) mitochondrial membrane hyperpolarization that could

affect the energy production of the cell and lead to ATP depletion, ROS overproduction and ultimately, to cell death. However, this effect, although statistically significant, is very small and we cannot conclude that these changes were caused by the mechanism of action of OMP in these types of membranes.

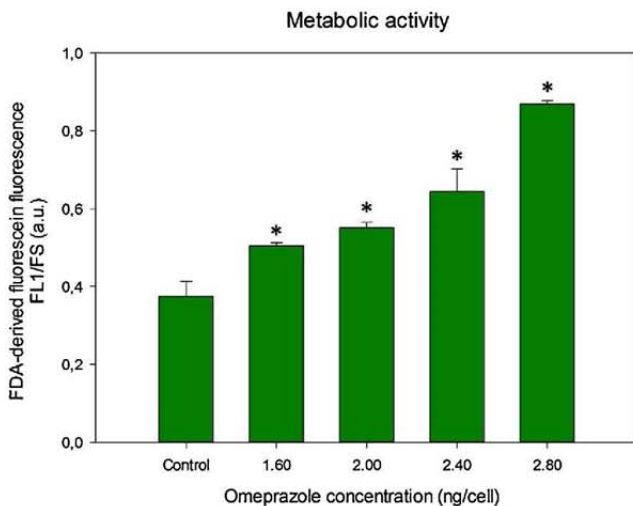


Fig. 5. Metabolic activity of the metabolically active population (FDA+) of *T. suecica* cells in control cultures and in cultures exposed to different concentrations (ng cell<sup>-1</sup>) of omeprazole for 24 h. Data are given as mean  $\pm$  standard deviation of fluorescence values of FDA+ cells of three replicates. Significant differences with respect to control at a level of significance of 0.05 ( $p < 0.05$ ) are represented by an asterisk (\*).

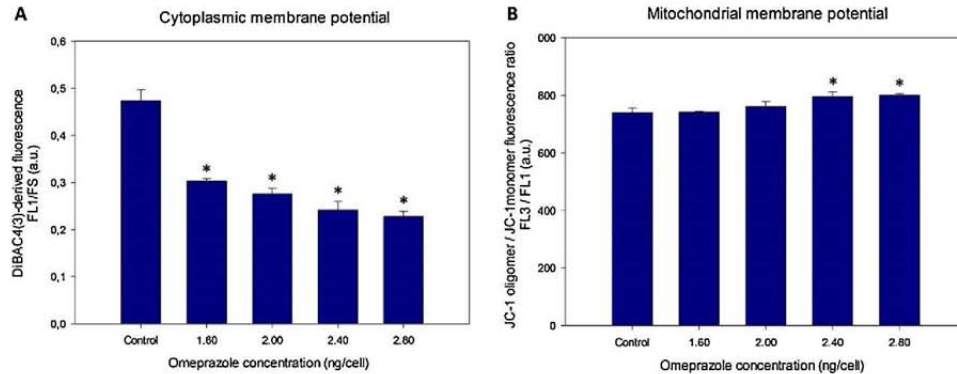


Fig. 6. Cytoplasmic (A) and mitochondrial (B) membrane potentials of *T. suecica* cells in control cultures and in cultures exposed to different concentrations ( $\text{ng cell}^{-1}$ ) of omeprazole for 24 h. Data are given as mean  $\pm$  standard deviation of the fluorescence values of three replicates. Significant differences with respect to control at a level of significance of 0.05 ( $p < 0.05$ ) are represented by an asterisk (\*).

### 3.6. Intracellular pH (pH<sub>i</sub>)

All OMP concentrations assayed affected pH<sub>i</sub> of *T. suecica* cells in a concentration-dependent manner. Treated cultures showed a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in the green/orange BCECF fluorescence intensity ratio, indicating an intracellular acidification of their cytoplasm (Fig. 7).

Cytoplasmic pH in eukaryotic cells is strictly regulated by ion transport mechanisms and a high buffering capacity of the cytosol. Protons play many roles in signalling, development, and metabolic regulation and eukaryotes have developed a range of pH homeostatic mechanisms. Intracellular pH regulation involves H<sup>+</sup> buffering, and metabolic H<sup>+</sup> consumption and production together with transmembrane H<sup>+</sup> transport and compartmentalization (Taylor et al., 2012). As discussed before, the mechanism of action of OMP is the inhibition of the gastric proton pump (H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase) (Kosma et al., 2016) and this compound may also affect cytoplasmic H<sup>+</sup>-ATPases on non-target organisms such as microalgae. Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases extrude H<sup>+</sup> to the outside of the cell and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases transport H<sup>+</sup> from the cytoplasm towards intracellular compartments (vacuoles);

therefore, the inhibition of these pumps by the pollutant could lead to cytosol acidification.

Maintaining the physiological pH in optimal range is important for the activity of many enzymes, for the efficiency of contractile elements and the conductivity of ion channels. Regarding the increase in FDA fluorescence mentioned and discussed above (Fig. 5), it could also be either due to a simple increase in the uptake of FDA as consequence of cell membrane hyperpolarization or due to an effect of the contaminant on intracellular ionic regulation, leading to changes in intracellular pH (Nancharaiyah et al., 2007). Also, pH oscillations seem to be important in controlling the cell cycle and the proliferative capacity of cells (Madshus, 1988), which relates to the growth results obtained (Table 1).

Marine environments are typically defined by high Na<sup>+</sup> concentrations and a relatively stable, mildly alkaline pH (8.2) of the seawater (Taylor et al., 2012). It has been shown that this high electrochemical potential gradient is utilized by marine organisms, such as cyanobacteria and microalgae, that use P-type Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases as the primary transport mechanism to generate electrochemical gradients across the plasma membrane (Hellebust 1978; Rees et al., 1980; Raven 1984). The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger is expressed in the vast majority of

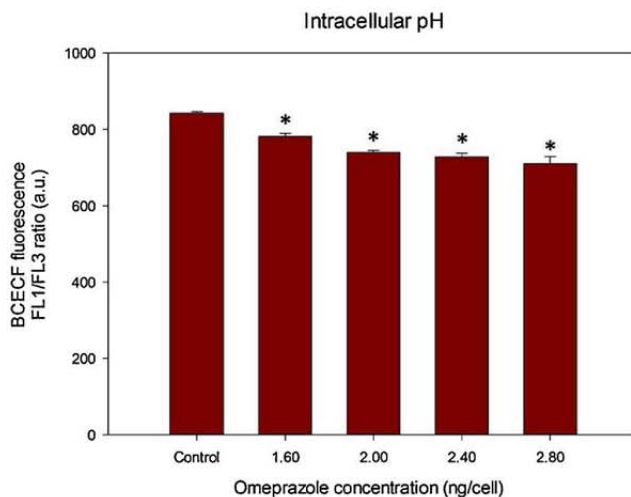


Fig. 7. Intracellular pH of *T. suecica* cells in control cultures and in cultures exposed to different concentrations ( $\text{ng cell}^{-1}$ ) of omeprazole for 24 h. Data are given as mean  $\pm$  standard deviation of fluorescence values of three replicates. Significant differences with respect to control at a level of significance of 0.05 ( $p < 0.05$ ) are represented by an asterisk (\*).

eukaryotic cells and it is the regulatory mechanism of intracellular pH homeostasis employed in many marine phytoplankton (Noël and Pouységur, 1995). The  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger uses the  $\text{Na}^+$  ion electrochemical gradient, generated by the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, to extract  $\text{H}^+$  from the cellular cytosol. The presence of OMP in marine environments could affect the function of proton pumps that regulate pH gradients. The inhibition of these pumps could provoke the acidification of the pH, observed (Fig. 7). The literature suggests that proton pump inhibitors such as OMP provoke disruption of the intra-extracellular pH-gradient and accumulation of protons in the cytosol of tumour cells. Proton pump inhibition triggers a rapid cell death in this type of cells as a result of intracellular acidification, caspase activation and early accumulation of ROS (Luciani et al., 2004; Marino et al., 2010).

#### 4. Conclusions

The potential acute toxicity of OMP on the marine microalga *T. suecica* was evaluated analysing several cytotoxicity biomarkers after 24 h of exposure. Results showed that OMP caused a decrease in growth and autofluorescence, an increase in cell size and intracellular complexity, hyperpolarization of cytoplasmic and mitochondrial membranes and intracellular acidification. In addition, large amounts of ROS were generated which resulted in a decrease in the percentage of the viable population. However, the viable population showed an increase in the metabolic activity as an early response to overcome the stress. The physiological parameters analysed by flow cytometry reveal early alterations and offer information regarding the toxic mechanisms by which this emerging pollutant upsets biological processes on microalgae. OMP may trigger receptors in unicellular organisms that regulate the proton flux in the cytosol, disturbing pH homeostasis and provoking an early accumulation of ROS that resulted in a rapid cell death in cells cultured with the highest concentration assayed.

#### Acknowledgements

M.S. and M.E. acknowledge their pre-doctoral fellowship from Xunta de Galicia (Spain).

#### References

- Adler, N.E., Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., 2007. Flow cytometry as a tool to study cytotoxic modes of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 297–306.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399.
- Benov, L., Szejnberg, L., Fridovich, I., 1998. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 826–831.
- Besse, J.-P., Kausch-Barreto, C., Garric, J., 2008. Exposure assessment of pharmaceuticals and their metabolites in the aquatic environment: application to the French situation and preliminary prioritization. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 14, 665–695.
- Boix, C., Ibáñez, M., Zamora, T., Sancho, J.V., Niessen, W.M.A., Hernández, F., 2014. Identification of new omeprazole metabolites in wastewaters and surface waters. *Sci. Total Environ.* 468–469, 706–714.
- Bray, D.F., Bagu, J.R., Nakamura, K., 1993. Ultrastructure of *Chlamydomonas reinhardtii* following exposure to paraquat: comparison of wild type and a paraquat-resistant mutant. *Can. J. Bot.* 71, 174–182.
- Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, M.P., Saoncella, A., 2001. An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Res.* 35, 69–76.
- Chankova, S.G., Dimova, E.G., Mitrovska, Z., Miteva, D., Mokerova, D.V., Yonova, P.A., Yurina, N.P., 2014. Antioxidant and HSP70 B responses in *Chlamydomonas reinhardtii* genotypes with different resistance to oxidative stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 101, 131–137.
- Chou, T.C., Martin, N., 2005. CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantification of Synergism and Antagonism in Drug Combinations and the Determination of IC50 and ED50 and LD50 Values. ComboSyn, Inc., Paramus, NJ.
- Christen, V., Hickmann, S., Rechenberg, B., Fent, K., 2010. Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: a concept for their identification based on their mode of action. *Aquat. Toxicol.* 96, 167–181.
- Cid, Á., Fidalgo, P., Herrero, C., Abalde, J., 1996. Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry. *Cytometry* 25, 32–36.
- Cid, A., Torres, E., Herrero, C., Abalde, J.E., 1997. Disorders provoked by copper in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* in short-time exposure assays. *Cah. Biol. Mar.* 38, 201–206.
- Cleivers, M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142, 185–194.
- D'Autréaux, B., Toledano, M.B., 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 813–824.
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Mirakami, T., Traganos, F., 1997. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27, 1–20.
- Debellus, B., Forja, J.M., DelValls, A., Lubián, L.M., 2009. Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1503–1513.
- DellaGreca, M., Fiorentino, A., Iesce, M.R., Isidori, M., Nardelli, A., Previtera, L., 2003. Identification of phototransformation products of prednisone by sunlight toxicity of the drug and its derivatives on aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 534–539.
- DellaGreca, M., Iesce, M.R., Previtera, L., Rubino, M., Temussi, F., Brigante, M., 2006. Degradation of lansoprazole and omeprazole in the aquatic environment. *Chemosphere* 63, 1087–1093.
- Dewez, D., Geoffroy, L., Vernet, G., Popovic, R., 2005. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquat. Toxicol.* 74, 150–159.
- Dikshit, M., Sharma, P., 2001. Nitric oxide mediated modulation of free radical generation response in the rat polymorphonuclear leukocytes: a flow cytometric study. *Methods Cell Sci.* 24, 69–76.
- Diniz, M.S., Salgado, R., Pereira, V.J., Carvalho, G., Oehmen, A., Reis, M.A.M., Noronha, J.P., 2015. Ecotoxicity of ketoprofen, diclofenac, atenolol and their photolysis by-products in zebrafish (*Danio rerio*). *Sci. Total Environ.* 505, 282–289.
- Dinsdale, M.G., Lloyd, D., Jarvis, B., 1995. Yeast vitality during cider fermentation: two approaches to the measurement of membrane potential. *J. Inst. Brew.* 101, 453–458.
- Eigemann, F., Hilt nee Körner, S., Schmitt-Jansen, M., 2013. Flow cytometry as a diagnostic tool for the effects of polyphenolic allelochemicals on phytoplankton. *Aquat. Bot.* 104, 5–14.
- Ekmeçli, Y., Terzioğlu, S., 2005a. Effects of oxidative stress induced by paraquat on wild and cultivated wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.* 83, 69–71.
- Ekmeçli, Y., Terzioğlu, S., 2005b. Effects of oxidative stress induced by paraquat on wild and cultivated wheats. *Pestic. Biochem. Physiol.* 83, 69–81.
- Esperanza, M., Cid, Á., Herrero, C., Rioboo, C., 2015a. Acute effects of a prooxidant herbicide on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: Screening cytotoxicity and genotoxicity endpoints. *Aquat. Toxicol.* 165, 210–221.
- Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2015b. *Chlamydomonas reinhardtii* cells adjust the metabolism to maintain viability in response to atrazine stress. *Aquat. Toxicol.* 165, 64–72.
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159.
- Francq, P., Petitpain, N., Cherlet, M., Dardennes, M., Maachi, F., Schutz, B., Poisson, L., Nabet, P., 1996. Measurement of intracellular pH in cultured cells by flow cytometry with BCECF-AM. *J. Biotechnol.* 46, 187–195.
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Lim, R.P., 2001. Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 160–170.
- Geiger, E., Hornek-Gausterer, R., Saçan, M.T., 2016. Single and mixture toxicity of pharmaceuticals and chlorophenols to freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 129, 189–198.
- Gerencser, A.A., Chinopoulos, C., Birket, M.J., Jastroch, M., Vitelli, C., Nicholls, D.G., Brand, M.D., 2012. Quantitative measurement of mitochondrial membrane potential in cultured cells: calcium-induced de- and hyperpolarization of neuronal mitochondria. *J. Physiol.* 590, 2845–2871.
- Gergely, P., Grossman, C., Niland, B., Puskas, F., Neupane, H., Allam, F., Banki, K., Phillips, P.E., Perl, A., 2002. Mitochondrial hyperpolarization and ATP depletion in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 46, 175–190.
- Gibbin, E.M., Davy, S.K., 2013. Intracellular pH of symbiotic dinoflagellates. *Coral Reefs* 32, 859–863.
- Giovannini, C., Matarrese, P., Scazzocchio, B., Sanchez, M., Masella, R., Malorni, W., 2002. Mitochondria hyperpolarization is an early event in oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in Caco-2 intestinal cells. *FEBS Lett.* 523, 200–206.
- Green, K., Brand, M.D., Murphy, M.P., 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 53, S110–S118.
- Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Litzøft, H.C., Jørgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review. *Chemosphere* 36, 357–393.
- Hallwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141, 312–322.
- Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131, 5–17.
- Hellebust, J.A., 1978. Uptake of organic substrates by *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae): effects of ions, ionophores and metabolic and inhibitors. *J. Phycol.* 14, 79–83.
- Herrero, C., Cid, Á., Fábregas, J., Abalde, J., 1991. Yields in biomass and chemical constituent of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquacult. Eng.* 10, 99–110.
- Hess, F.D., 2000. Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Sci.* 48, 160–170.
- Hilden, S.A., Johns, C.A., Madias, N.E., 1968. Cl-dependent ATP-driven  $\text{H}^+$  transport in rabbit renal cortical endosomes. *Am. J. Physiol.* 255, F885–F897.
- Horn, J., 2000. The proton-pump inhibitors: similarities and differences. *Clin. Ther.* 22, 266–280.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Previtera, L., Rubino, M., 2005. Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Sci. Total Environ.* 348, 93–101.
- Jain, K.S., Shah, A.K., Bariwal, J., Shelke, S.M., Kale, A.P., Jagtap, J.R., Bhosale, A.V., 2007. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 1181–1205.
- Jamers, A., Lenjou, M., Deneedt, P., Van Bockstaele, D., Blust, R., de Coen, W., 2009. Flow cytometric analysis of the cadmium-exposed green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

- (Chlorophyceae). *Eur. J. Phycol.* 44, 541–550.
- Jamers, A., Blust, R., De Coen, W., Griffin, J.L., Jones, O.A.H., 2013. Copper toxicity in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: an integrated approach. *Biometales* 26, 731–740.
- Jochem, F.J., 1999. Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with fluorescein diacetate. *Mar. Biol.* 135, 721–728.
- Kümmerer, K., 2010. Pharmaceuticals in the environment. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 35, 57–75.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams: 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211.
- Konrad, K.R., Hedrich, R., 2008. The use of voltage-sensitive dyes to monitor signal-induced changes in membrane potential-ABA triggered membrane depolarization in guard cells. *Plant J.* 55, 161–173.
- Kosma, C.I., Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., 2016. Analysis, occurrence, fate and risks of proton pump inhibitors, their metabolites and transformation products in aquatic environment: a review. *Sci. Total Environ.* 569–570, 732–750.
- Kosma, C.I., Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., 2017. Photochemical transformation and wastewater fate and occurrence of omeprazole: HRMS for elucidation of transformation products and target and suspect screening analysis in wastewaters. *Sci. Total Environ.* 590–591, 592–601.
- Lage, O.M., Sansonetti, 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 226e235.
- Leal, A.M.D.S., de Queiroz, J.D.F., de Medeiros, S.R.B., Lima, T.K.D.S., Agnez-Lima, L.F., 2015. Violacin induces cell death by triggering mitochondrial membrane hyperpolarization in vitro. *BMC Microbiol.* 15, 115.
- Liu, W., Ming, Y., Huang, Z., Li, P., 2012. Impacts of florphenicol on marine diatom *Skeletonema costatum* through photosynthesis inhibition and oxidative damages. *Plant Physiol. Biochem.* 60, 165–170.
- Lloyd, D., Harris, J.C., Biagini, G.A., Hughes, M.R., Maroulis, S., Bernard, C., Wadley, R.B., Edwards, M.R., 2004. The plasma membrane of microaerophilic protists: oxidative and nitrosative stress. *Microbiology* 150, 1183–1190.
- Luciani, F., Spada, M., De Milito, A., Molinari, A., Rivoltini, L., Montinaro, A., Marra, M., Lugini, L., Logozzi, M., Lozupone, F., Federici, C., Iessi, E., Parmiani, G., Arancia, G., Belardelli, F., Fais, S., 2004. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1702–1713.
- Madhusu, I.H., 1988. Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem. J.* 250, 1–8.
- Marino, M.L., Pais, S., Djavaheri-Mergny, M., Villa, A., Meschini, S., Lozupone, F., Venturi, G., Della Mina, P., Pattinere, S., Rivoltini, L., Codogno, P., De Milito, A., 2010. Proton pump inhibition induces autophagy as a survival mechanism following oxidative stress in human melanoma cells. *Cell. Death. Dis.* 1, e87.
- Mason, D.J., Allman, R., Stark, J.M., Lloyd, D., 1994. Rapid estimation of bacterial antibiotic susceptibility with flow cytometry. *J. Microsc.* 176, 8–16.
- McCormick, P.V., Cairns, J.J., 1994. Algae as indicators of environmental change. *J. Appl. Phycol.* 6, 509–526.
- Moreno-Garrido, I., Lubián, L.M., Soares, A.M., 2000. Influence of cellular density on determination of EC<sub>50</sub> in microalgal growth inhibition tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47, 112–116.
- Nancharaiyah, Y.W., Rajadurai, M., Venugopalan, V.P., 2007. Single cell level microalgal ecotoxicity assessment by confocal microscopy and digital image analysis. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2617–2621.
- Nicholls, D.G., 2004. Mitochondrial membrane potential and aging. *Aging Cell* 3, 35–40.
- Noel, J., Pouyssegur, J., 1995. Hormonal regulation, pharmacology and membrane sorting of vertebrate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms. *Am. J. Physiol.* 268, C283–296.
- Oldenhof, H., Blová, K., Van Den Ende, H., Zachleder, V., 2004. Effect of red and blue light on the timing of cyclin-dependent kinase activity and the timing of cell division in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 341–348.
- Ortiz de García, S., Pinto Pinto, G., García Encina, P., Irusta Mata, R., 2013. Consumption and occurrence of pharmaceutical and personal care products in the aquatic environment in Spain. *Sci. Total Environ.* 444, 451–465.
- Ortiz de García, S.A., Pinto, G., García-Encina, P.A., Irusta-Mata, R., 2014. Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants. *Ecotoxicology* 23, 1517–1533.
- Palmgren, M.G., Buch-Pedersen, M.J., Møller, A.L., 2003. Mechanism of proton pumping by plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: role of residues in transmembrane segments 5 and 6. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 5, 188–197.
- Pedersen, P.L., 2007. Transport ATPases into the year 2008: A brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39, 349–355.
- Perry, S.W., Norman, J.P., Barbieri, J., Brown, E.B., Harris, A., 2011. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* 50, 98–115.
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Abalde, J., Cid, Á., 2009. Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat. *Environ. Int.* 35, 240–247.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2011. Characterization of cell response in *Chlamydomonas moewusii* cultures exposed to the herbicide paraquat: induction of chlorosis. *Aquat. Toxicol.* 102, 10–17.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2012. Screening acute cytotoxicity biomarkers using a microalga as test organism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 86, 219–226.
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2015. Suitability of cytotoxicity endpoints and test microalgal species to disclose the toxic effect of common aquatic pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 114, 117–125.
- Qin, Y., Lu, M., Gong, X., 2008. Dihydrochloramine 123 is superior to 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate and dihydrochloramine 6G in detecting intracellular hydrogen peroxide in tumor cells. *Cell. Biol. Int.* 32, 224–228.
- Rabinovitch, P.S., June, C.H., 1990. Intracellular ionized calcium, membrane potential, and pH. In: Ormerod, M.G. (Ed.), *Flow Cytometry. A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 161–185.
- Raven, J.A., 1984. *Energetics and Transport in Aquatic Plants*. MBL Lectures in Biology, vol. 4 Alan R. Iss, New York.
- Rees, T.A., Creswell, R.C., Syrett, P.J., 1980. Sodium-dependent uptake of nitrate and urea by marine diatom. *Biochim. Biophys. Acta* 596, 141–144.
- Rioboo, C., Prado, R., Herrero, C., Cid, Á., 2007. Population growth study of the rotifer *Brachionus* sp. fed with triazine-exposed microalgae. *Aquat. Toxicol.* 83, 247–253.
- Rioboo, C., O'Connor, J.E., Prado, R., Herrero, C., Cid, Á., 2009. Cell proliferation alterations in *Chlorella* cells under stress conditions. *Aquat. Toxicol.* 94, 229–237.
- Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J.A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M.J., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., 2010. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res.* 44, 578–588.
- Rosenwasser, S., van Crevelde, G.S., Schatz, D., Malitsky, S., Tzfadia, O., Aharoni, A., Levin, Y., Gabashvili, A., Feldmesser, E., Vardi, A., 2014. Mapping the diatom redox-sensitive proteome provides insight into response to nitrogen stress in the marine environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2740–2745.
- Sanderson, H., Thomsen, M., 2009. Comparative analysis of pharmaceuticals versus industrial chemicals acute aquatic toxicity classification according to the United Nations classification system for chemicals. Assessment of the (Q)SAR predictability of pharmaceuticals acute aquatic toxicity and their predominant acute toxic mode-of-action. *Toxicol. Lett.* 187, 84–93.
- 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. *Mar. Environ. Res.* 101, 1–7.
- Seoane, M., Esperanza, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2017. Flow cytometric assay to assess short-term effects of personal care products on the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Chemosphere* 171, 339–347.
- Shapiro, H.M., 1995. *Practical Flow Cytometry*, third ed. Wiley-Liss Inc., New York p. 542.
- Spanish Ministry of Health, Social Services and Equality. **Annual report of the National Health System, Madrid, 2015.** Available online on <http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInSanSNS/tablasEstadisticas/InFANSNS.htm>. Accessed on January, 2017.
- Sterbini, P.P., Palladini, A., Masucci, L., Cannistraci, C.V., Pastorino, R., Ianiro, G., Bugli, F., Martini, C., Ricciardi, W., Gasbarrini, A., Sanguineti, M., Cammarota, G., Posteraro, B., 2016. Effects of proton pump inhibitors on the gastric mucosa-associated microbiota in dyspeptic patients. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 6633–6644.
- Suntres, Z.E., 2002. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology* 180, 65–77.
- Szivaik, I., Behra, R., Sigg, L., 2009. Metal-induced reactive oxygen species production in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 45, 427–435.
- Taylor, A.R., Brownlee, C., Wheeler, G.L., 2012. Proton channels in algae: reasons to be excited. *Trends Plant Sci.* 17, 675–684.
- Tsiaka, P., Tsarpali, V., Ntaliou, I., Kostopoulou, M.N., Lyberatos, G., Dalianis, S., 2013. Carbamazepine-mediated pro-oxidant effects on the unicellular marine algal species *Dunaliella tertiolecta* and the hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology* 22, 1208–1220.
- United Nations, 2011. *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, 4th edn. United Nations Publications, New York.
- Vesper, B.J., Jawdi, A., Altman, K.W., Haines III, G.K., Tao, L., Radosovich, J.A., 2009. The effect of proton pump inhibitors on the human microbiota. *Curr. Drug Metab.* 10, 84–89.
- Villain, J., Minguéz, L., Halm-Lemelle, M.P., Durrieu, G., Bureau, R., 2016. Acute toxicities of pharmaceuticals toward green algae: mode of action: biopharmaceutical drug disposition classification system and quantile regression models. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 124, 337–343.
- Webb, S.F., 2001. A data based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals II - aquatic risk characterisation. In: Kümmerer, K. (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 203–219.
- Wolff, C., Fuks, B., Chatelain, P., 2003. Comparative study of membrane potential-sensitive fluorescent probes and their use in ion channel screening assays. *J. Biomol. Screen* 8, 533–543.
- Zhang, W., Zhang, M., Lin, K., Sun, W., Xiong, B., Guo, M., Cui, X., Fu, R., 2012. Ecotoxicological effect of carbamazepine on *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 344–352.
- van Crevelde, S.G., Rosenwasser, S., Schatz, D., Koren, I., Vardi, A., 2014. Early perturbation in mitochondria redox homeostasis in response to environmental stress predicts cell fate in diatoms. *ISME J.* 9, 1–11.





### 4.3. Capítulo III: Panel citómico para evaluar los efectos a corto plazo de la exposición a distintos productos de cuidado e higiene personal en la microalga marina *Tetraselmis suecica*.

Los productos de cuidado e higiene personal (PCPs) son un grupo diverso de compuestos usados en jabones, pastas de dientes, perfumes, protectores solares, etc. Estos productos se utilizan a diario en gran cantidad, por lo que muchos de sus ingredientes alcanzan finalmente los ecosistemas acuáticos, donde ya han sido reconocidos como contaminantes emergentes. Dado que son productos destinados a uso externo, tienen un gran potencial para entrar inalterados en el medio ambiente. A pesar de que ya han sido detectados con frecuencia en las aguas superficiales de todo el mundo, se sabe relativamente poco acerca de su ecotoxicidad, por lo que son necesarios datos adicionales sobre la toxicidad de estos compuestos en organismos marinos para llevar a cabo evaluaciones de riesgo ambiental y determinar su impacto en estos ecosistemas.

El objetivo de este capítulo se centra en evaluar la potencial citotoxicidad de tres contaminantes emergentes, incluidos en las principales clases de PCPs, en la microalga marina *T. suecica*. Los PCPs utilizados fueron el filtro UV orgánico benzofenona-3 (BP-3), el desinfectante triclosán (TCS) y la fragancia sintética policíclica tonalide (AHTN). Las concentraciones ensayadas para cada compuesto (de 0,25 a 2 mg L<sup>-1</sup> para la BP-3; de 0,1 a 0,8 mg L<sup>-1</sup> para el TCS y de 0,06 a 0,12 mg L<sup>-1</sup> para el AHTN) se seleccionaron en función de los valores de EC<sub>50</sub> a las 96 h obtenidos en ensayos previos de inhibición del crecimiento, como se indica en el apartado de Material y Métodos. Se diseñó un pequeño panel citómico para evaluar el tamaño y autofluorescencia celular, la tasa de crecimiento, la actividad metabólica y el potencial e integridad de la membrana plasmática, tras sólo 24 h de exposición, con el fin de establecer potenciales biomarcadores de citotoxicidad a corto plazo.

Los tres PCPs ensayados causaron alteraciones significativas en las células, sin que se pudiesen observar cambios en la viabilidad celular. Teniendo en cuenta las concentraciones utilizadas, la fragancia AHTN fue el compuesto más tóxico, seguido

por el TCS y, por último, la BP-3, ya que el AHTN mostró alteraciones significativas a concentraciones mucho más bajas. Este compuesto es poco biodegradable, muy lipofílico, persistente y con un alto potencial de bioacumulación, por lo que es un contaminante potencialmente perjudicial para la salud humana y el medio ambiente.

Los contaminantes ensayados pueden clasificarse en dos grupos basándose en la respuesta citotóxica observada, uno de ellos formado sólo por la BP-3 y el otro grupo por TCS y AHTN. La BP-3 causó un aumento en la tasa de crecimiento y en la actividad esterasa. Esta estimulación metabólica general puede entenderse como una respuesta de adaptación de las células a las condiciones ambientales adversas debido a la activación de mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo. También se observó una disminución en el tamaño celular con respecto a las células control, ya que las células tratadas con BP-3 son capaces de completar el ciclo celular y dividirse más rápidamente que las células no expuestas, como resultado del incremento en la tasa de crecimiento y la actividad metabólica ya comentado. Además, se observó un aumento de la autofluorescencia de las microalgas expuestas que sugiere un descenso en la fotosíntesis debido a alteraciones en el aparato fotosintético. La BP-3 es un filtro solar que absorbe la radiación UV, capta la energía incidente y la reemite nuevamente como radiación térmica, por lo que cabría esperar que afecte las propiedades fotosintéticas de las microalgas. Por último, se detectó una despolarización de la membrana plasmática, indicando alteraciones en bombas o canales que causan desequilibrios iónicos y de carga.

Por otro lado, TCS y AHTN mostraron un patrón de citototoxicidad a corto plazo común para ambos en *T. suecica*, opuesto al observado con la BP-3. Estos dos compuestos causaron un aumento en el volumen celular, más acusado en el caso del TCS, probablemente debido a la incapacidad de las células expuestas de completar el ciclo celular y finalizar la división, como se refleja en el descenso de la tasa de crecimiento y la actividad metabólica. Además, en el caso del TCS se observó una hiperpolarización celular muy acusada, y estas alteraciones en la permeabilidad de la membrana, pueden dar lugar a cambios osmóticos que expliquen también el aumento

del tamaño. El TCS es un agente antimicrobiano diseñado para matar o inhibir el crecimiento de una gran variedad de especies microbianas, por lo que es probable que tenga un impacto significativo en las comunidades bióticas naturales. Algunos de los mecanismos de acción conocidos del TCS implican la desestabilización de las membranas provocando la pérdida de sus funciones de barrera semipermeable, lo que se relaciona con los resultados obtenidos. Este compuesto también provocó un descenso de la autofluorescencia que se puede relacionar con daños oxidativos del PSII, descenso del contenido en pigmentos o al blanqueamiento de la clorofila debido a la acción de ROS.

En el presente trabajo se caracterizó la respuesta citotóxica de *T. suecica* a tres PCPs mediante CMF para analizar sus efectos sobre diferentes propiedades inherentes celulares y sobre el estado fisiológico de la célula en función de su actividad metabólica y la estabilidad de su membrana. Mediante el uso de fluorocromos, la CMF permite el estudio de las interferencias de los contaminantes ensayados con procesos metabólicos específicos, elucidando el modo en que estos compuestos alteran los procesos biológicos en las células microalgales. Atendiendo a los resultados obtenidos, podemos concluir que la respuesta citotóxica varía en función del contaminante emergente objeto de estudio, pero en todos los casos, los parámetros más sensibles fueron la actividad esterasa y el potencial de membrana citoplasmático. En particular, la actividad esterasa ha demostrado tener una relación directa con la actividad metabólica general, por lo que ayuda a discriminar entre células sanas y “estresadas”, cuantificando respuestas sutiles frente a los impactos ambientales. El estudio de las alteraciones de la membrana plasmática también resultó ser muy sensible, pues los tres PCPs ensayados dañaron la membrana microalgal principalmente mediante la alteración de su permeabilidad, antes de verse comprometida su integridad. Por ello, los biomarcadores analizados demostraron ser útiles indicadores tempranos de toxicidad ya que se detectaron alteraciones en la fisiología de las microalgas expuestas antes de que se viera afectada la viabilidad. Los resultados obtenidos respaldan el

potencial uso de los protocolos ensayados en la detección de la posible citotoxicidad de este tipo de contaminantes emergentes en el medio marino.

A continuación, se adjunta la correspondiente publicación.

Seoane, M., Esperanza, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2017. Flow cytometric assay to assess short-term effects of personal care products on the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Chemosphere* 171, 339-347.  
doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.12.097



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chemosphere](http://www.elsevier.com/locate/chemosphere)

## Flow cytometric assay to assess short-term effects of personal care products on the marine microalga *Tetraselmis suecica*



Marta Seoane, Marta Esperanza, Carmen Rioboo, Concepción Herrero, Ángeles Cid\*

Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus da Zapateira s/n, 15071 A Coruña, Spain

### HIGHLIGHTS

- *T. suecica* showed physiological alterations after 24 h of exposure to the three PCPs.
- The UV filter benzophenone-3 caused stimulation of growth rate and metabolic activity.
- Growth and esterase activity decreased in cells exposed to triclosan and tonalide.
- Treated cells remained viable but they showed changes in membrane potential.

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 8 July 2016  
Received in revised form  
29 November 2016  
Accepted 20 December 2016  
Available online 21 December 2016

Handling Editor: Frederic Leusch

**Keywords:**  
Microalga  
Emerging pollutants  
Personal care products  
Flow cytometry  
Cytotoxicity

### ABSTRACT

Large quantities of personal care products (PCPs) are used daily and many of their chemical ingredients are subsequently released into marine environments. Cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica* were exposed for 24 h to three emerging compounds included in the main classes of PCPs: the UV filter benzophenone-3 (BP-3), the disinfectant triclosan (TCS) and the fragrance tonalide (AHTN). Concentrations tested, expressed as cellular quota ( $\text{pg cell}^{-1}$ ), ranged from 5 to 40 for BP-3, from 2 to 16 for TCS and from 1.2 to 2.4 for AHTN. A small cytometric panel was carried out to evaluate key cytotoxicity biomarkers including inherent cell properties, growth and metabolic activity and cytoplasmic membrane properties. BP-3 caused a significant increase in growth rate, metabolic activity and chlorophyll *a* fluorescence from  $10 \text{ pg cell}^{-1}$ . However, growth and esterase activity decreased in cells exposed to all TCS and AHTN concentrations, except the lowest ones. Also these two compounds provoked a significant swelling of cells, more pronounced in the case of TCS-exposed cells. Although all treated cells remained viable, changes in membrane potential were observed. BP-3 and AHTN caused a significant depolarization of cells from 10 to  $1.6 \text{ pg cell}^{-1}$ , respectively; however all TCS concentrations assayed caused a noticeable hyperpolarization of cells. Metabolic activity and cytoplasmic membrane potential were the most sensitive parameters. It can be concluded that the toxicological model used and the toxicological parameters evaluated are suitable to assess the toxicity of these emerging contaminants.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Chemical pollution supposes a threat to marine environment and to human health and it also may be an obstacle to the exploitation of its resources (Sánchez-Avila et al., 2012). Among marine environments, coastal waters are particularly vulnerable to pollution since coastlines are usually highly urbanized regions with important industrial activities and they are considered the ultimate sink for sewage and other by-products of human activities. In

addition, compared to the open sea, levels of pollution of coastal waters are substantially higher, since the effect of dilution and regeneration is much lower, especially when the water is stagnant or confined as in the case of ports and bays (Gimeno et al., 2004).

The development of new highly sensitive analytical techniques has revealed the presence of a large amount of chemical compounds in the aquatic environment that have been generically termed emerging pollutants. These compounds are pollutants that are currently not included in routine monitoring programmes and whose fate, behaviour and ecotoxicological effects are not well understood (Naidu et al., 2016). According to the NORMAN Network (URL, NORMAN Network), emerging environmental substances are not necessarily new chemicals; they are probably

\* Corresponding author.  
E-mail address: [angeles.cid@udc.es](mailto:angeles.cid@udc.es) (Á. Cid).

substances that have often long been present in the environment but whose presence and significance are only now being elucidated. Emerging contaminants are discharged daily to seawater via river inputs, which can transport pollutants from inland activities, but insufficiently treated municipal wastewater discharge is identified as the major route responsible for surface seawater contamination by emerging pollutants (Dai et al., 2014). As a result, these compounds can be found in detectable concentrations in waters worldwide (Wilson et al., 2003). However, the awareness of the potential environmental impacts of these compounds has become evident in recent years (Sauvé and Desrosiers, 2014).

Personal care products (PCPs) are a diverse group of emerging compounds used in all kind of cosmetic formulas such as soaps, lotions, toothpastes, fragrances or sunscreens. PCPs are products intended for external use on the human body and thus are not subjected to metabolic alterations; therefore, large quantities of PCPs enter the environment unaltered through regular usage (Brausch and Rand, 2011). Their occurrence in aquatic environments and in wastewater treatment plants is highly relevant and has been previously reported (Ortiz de García et al., 2013; Tovar-Sánchez et al., 2013; Rodil et al., 2012). PCPs are among the most commonly detected compounds in surface water throughout the world (Peck, 2006); however, in comparison to other groups of pollutants such as pesticides or pharmaceuticals, relatively little is known about their ecotoxicity (Daughton and Ternes, 1999).

Microalgae have been frequently used in ecotoxicological screening of contaminated water, and also as test microorganisms for *in vitro* toxicity bioassays due to their characteristics and position in the aquatic food web. Previous studies about the toxic effects of different pollutants on microalgal physiology (Esperanza et al., 2015a; Prado et al., 2015, 2012; Rioboo et al., 2009; Cid et al., 1996) demonstrate that flow cytometric analyses can be an alternative to standard algal population-based endpoints, since it allows a rapid, quantitative and simultaneous measurement of multiple responses to toxic stress in individual algal cells near *in vivo* conditions. Furthermore, the marine microalgal species used in the present work, *Tetraselmis suecica*, has been previously used to study the toxic effect of different antibiotics showing a high sensitivity (Seoane et al., 2014).

The aim of the present study was to evaluate the potential acute toxicity of three emerging compounds, included in the main classes of PCPs, on the marine microalga *T. suecica*. The emerging compounds investigated were the UV filter benzophenone-3 (BP-3), the disinfectant triclosan (TCS) and the fragrance tonalide (AHTN). Their potential toxicity has been analysed in previous studies (Paredes et al., 2014; Dann and Hontela, 2011; DeLorenzo and Fleming, 2008; Orvos et al., 2002) but data about their potential cytotoxic effects on non-target marine microalgae have largely been overlooked and additional data related to *in vivo* toxicity are needed to develop aquatic risk assessments (Brausch and Rand, 2011). Regarding this objective, a small cytometric panel for cytotoxicity screening was carried out to evaluate key potential biomarkers including relative cell volume, chlorophyll *a* fluorescence, metabolic activity and cytoplasmic membrane integrity and potential, together with traditional growth endpoint. These parameters were monitored after only 24 h of exposure to detect early alterations in the microalgal cell physiology.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microalgal cultures

*T. suecica* (Kylin) Butch (*Prasinophyceae*) was cultured in filtered (pore size: 0.20 μm) and autoclaved seawater enriched with Algal-1 medium (Herrero et al., 1991) under controlled conditions:

$18 \pm 1$  °C, illuminated with a photon flux of approximately 70 μmol photon  $m^{-2} s^{-1}$  under a dark:light cycle of 12:12 h. For the toxicity bioassays, batch cultures were carried out in Kimax glass tubes containing 40 mL of culture. Microalgal cells in early exponential growth phase were used as inoculum for the different assays and initial cell density was adjusted to  $5 \times 10^4$  cells  $mL^{-1}$ . All cultures were carried out in triplicate and cultures without tested chemicals were included as controls. The different analyses were done after 24 h of exposure since after this time an entire cell cycle and a light:dark cycle were completed. Moreover, it has been found that, in such a short time period, microalgae experienced metabolic adjustments in response to contaminants (Esperanza et al., 2015b).

### 2.2. Chemicals

PCPs tested were analytical standard or technical grade compounds with purity higher than 97%. Concentrations tested for each chemical compound were fixed taking into account the 96 h EC<sub>50</sub> values for growth obtained in previous toxicity tests and were expressed as cellular quota (mass of chemical substance per cell). These EC<sub>50</sub> values were 1, 0.4 and 0.1 mg  $L^{-1}$  for BP-3, TCS and AHTN, respectively.

BP-3 or oxybenzone (2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone; Fluka Chemicals) is an organic compound that works as a chemical UV filter capable to absorb ultraviolet radiation. Due to the growing concern about the harmful effects of exposure to ultraviolet radiation, the use of this compound has increased in all kind of cosmetic products to protect human skin from direct exposure to the deleterious wavelengths of sunlight (Giokas et al., 2007), but also as photostabilizer and sunblocking agent for the protection of materials against UV light. BP-3 concentrations tested ranged from 0.25 to 2 mg  $L^{-1}$ , which corresponds to 5–40 pg cell<sup>-1</sup>.

TCS (5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol; Sigma-Aldrich) is a broad-spectrum antimicrobial agent widely used as a preservative and disinfectant for over 40 years in PCPs of daily use. TCS is used as an ingredient in hand-disinfecting soaps, deodorants, toothpastes, skin creams, cosmetics or household cleaners, but it is also used in the manufacture of diverse products such as plastics, textiles, food or drugs (Daughton and Ternes, 1999). This compound is one of the most consumed disinfectants and its annual production is approximately 1.500 tons (Singer et al., 2002). TCS concentrations tested ranged from 0.1 to 0.8 mg  $L^{-1}$ , which corresponds to 2–16 pg cell<sup>-1</sup>.

AHTN (6-Acetyl-1,1,2,4,4,7-hexamethyltetralin; Sigma-Aldrich) is a polycyclic synthetic musk used in PCPs (perfumes, cosmetics, soaps, shampoos), household cleaners, fabric softeners and in disinfection and industrial products which not only contributes to give them characteristic and pleasant scent but it also serves to maintain the integrity of the products (García-Jares et al., 2002). This fragrance has been one of the most important in volume of production (Sumner et al., 2010). AHTN concentrations tested ranged from 0.06 to 0.12 mg  $L^{-1}$ , which corresponds to 1.2–2.4 pg cell<sup>-1</sup>.

Before each experiment, stock solutions were prepared dissolving each compound in methanol. Then, these solutions were diluted in order to add the same amount of methanol to all samples (directly comparable to the methanol control) and to reach the final tested concentrations indicated above. To achieve these nominal concentrations, stock solutions volume added to the microalgal cultures never exceed 0.05% of final culture volume. A small concentration of methanol was used because this solvent could increase the permeability of the PCPs to the microalga. A statistical comparison between 0.05% methanol controls and controls without this solvent revealed no significant difference in algal growth ( $t$  - test;  $p$  - value > 0.05), and all subsequent tests were

performed using only the solvent control. The contaminants were added to the cultures during the first hour of light to ensure that an entire light:dark cycle was completed before the analyses.

### 2.3. Flow cytometric analyses

Flow cytometric (FCM) analyses of *T. suecica* cells were performed on a Beckman-Coulter Gallios flow cytometer equipped with an argon-ion excitation laser (488 nm), detectors of forward (FS) and side (SS) light scatter and four fluorescence detectors corresponding to different wavelength intervals: 505–550 nm (FL1), 550–600 nm (FL2), 600–645 nm (FL3) and >645 nm (FL4).

Some parameters analysed by FCM were inherent properties of the cells, directly measured in the cytometer, while other physiological parameters were determined using different functional fluorochromes. Prior to the investigation, extensive experiments were conducted to optimize the probes concentrations and the incubation conditions in order to obtain significant, time-stable and non-toxic staining of cells.

Forward scatter (related to cell volume) and FL4 channel (red chlorophyll fluorescence) dot-plots were used to characterize the microalgal population and cells were gated based on these two parameters in order to exclude non-microalgal particles for the analyses. For each cytometric parameter investigated, at least  $10^4$  gated cells per sample were collected and fluorescence measurements were obtained in a logarithmic scale. Data were collected using listmode files and analysed using the Kaluza software version 1.1 (Beckman Coulter Inc.).

#### 2.3.1. Growth measurement

After 24 h of culture, cellular density was determined by counting culture aliquots of the different treatments in the flow cytometer using a suspension of fluorescent polystyrene microspheres with a known concentration (Flow-Count Fluorospheres; Beckman Coulter Inc.) for its calibration. Growth rates ( $\mu$ ) (expressed as day<sup>-1</sup>) were calculated using the following equation:

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

where  $N_t$  is the cell density at time  $t$  and  $N_0$  is the cell density at time 0.

#### 2.3.2. Relative cell volume

Cultures were analysed by FCM to study potential alterations on cell volume after 24 h of exposure to each pollutant. Forward light scatter (FS) is related to cell size or volume and FS intensity increases with the increase of cell cross-sectional area (Shapiro, 1995). Data were compiled as the mean value of the cell population since they had a normal (Gaussian) distribution. When differences in cellular volume mean value between treated and control cells were observed, the other parameters analysed were corrected by the FS signal.

#### 2.3.3. Chlorophyll *a* fluorescence

*T. suecica* presents natural autofluorescence due to the presence of chlorophyll *a* and other accessory pigments. Red chlorophyll *a* fluorescence was detected in the FL4 channel and data were collected as the mean fluorescence value of the cell population since they were normally distributed.

#### 2.3.4. Metabolic activity

Metabolic activity was studied using the fluorescein diacetate (FDA) cytometric assay, a rapid and sensitive technique to assess microalgal esterase activity (Jochem, 1999). Many authors have used FDA staining as a method to assess viability in microalgal cells

exposed to cytotoxic conditions (Prado et al., 2011; Lage et al., 2001), but in this study FDA was used to assess the vitality of viable cells, based on their esterase activity. Several studies that used flow cytometry with algae provide additional support to FDA as a measure of the “metabolic vigour” (Berglund and Eversman, 1988; Dorsey et al., 1989). After entering the cell, FDA-acetate residues are cleaved off by non-specific esterases and the polar hydrophilic fluorescent product fluorescein is retained by cells with intact plasma membranes. Since fluorescein is accumulated by active cells, metabolic activity can be measured by means of the fluorescent signal intensity emitted by cells, which is proportional to the amount of accumulated fluorescein and the time elapsed (Prado et al., 2009). Comparing any differences in the fluorescence emitted by metabolically active cells (FDA+), it is possible to detect changes in cellular metabolic activity or cell vitality. *T. suecica* cells were incubated with  $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $0.48 \mu\text{M}$ ) of FDA for 15 min as previously described in Seoane et al. (2014). Green fluorescein fluorescence was detected in the FL1 channel. Since data were normally distributed, mean fluorescence values of metabolically active cells population (FDA+) were collected.

#### 2.3.5. Cytoplasmic membrane integrity

Membrane integrity was assessed by propidium iodide (PI) permeability bioassay. PI was used to discriminate between viable non-fluorescent cells (PI) and non-viable fluorescent cells with damaged or disrupted cell membranes (PI+) (Cid et al., 1996). *T. suecica* cells were incubated with  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $4 \mu\text{M}$ ) of PI for 10 min as previously described in Seoane et al. (2014). PI orange fluorescent emission was collected in the FL3 detector. Data were collected as the percentage of viable cells vs. the total amount of cells analysed.

#### 2.3.6. Cytoplasmic membrane potential

Alterations on membrane potential were studied using a slow-response potentiometric probe, the bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (DiBAC<sub>4</sub>(3)). DiBAC<sub>4</sub>(3) can enter depolarized cells where it binds to intracellular proteins or membranes (Wolff et al., 2003). Increased depolarization of cell membranes results in additional influx of the anionic dye and an increase in fluorescence. Conversely, hyperpolarization is indicated by a decrease in fluorescence (Rabinovitch and June 1990). *T. suecica* cells were incubated with  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $0.97 \mu\text{M}$ ) of DiBAC<sub>4</sub>(3) for 10 min following the protocol previously described by Prado et al. (2012) adapted to *T. suecica*. DiBAC<sub>4</sub>(3) green fluorescent emission was collected in the FL1 channel. Data were collected as the mean fluorescence value of the cell population since data showed a normal distribution.

### 2.4. Statistical analysis of results

Mean and standard deviation (SD) values of the three biological replicates were determined for each treatment and for control cultures. Then, results were expressed as percentage of variation with respect to control, for which a value of 100% was assigned. These data were statistically analysed by an overall one-way analysis of variance (ANOVA) using IBM SPSS Statistics software 21.0. A  $p$ -value < 0.05 was considered statistically significant. When significant differences were observed, control vs. treated means were compared using the Dunnett *post hoc* test ( $p < 0.05$ ).

## 3. Results

### 3.1. Inherent cell properties

After only 24 h of exposure, the presence of the PCPs tested in

the culture medium caused alterations on the inherent cell properties analysed. Cells cultured in the presence of BP-3 showed a slight decrease in the FS signal, related to a decrease in cell volume, being only statistically significant ( $p < 0.05$ ) in cultures exposed to the highest concentration assayed ( $40 \text{ pg cell}^{-1}$ ) (Fig. 1A). On the contrary, an increase in the FS signal, related to an increase in cell size, was observed in cells exposed to the other two compounds tested. All AHTN concentrations assayed caused a significant ( $p < 0.05$ ) swelling of the cells, except the lowest one ( $1.2 \text{ pg cell}^{-1}$ ) (Fig. 1C). The most noticeable increment in volume occurs in cultures exposed to TCS. All TCS concentrations tested significantly increased ( $p < 0.05$ ) the cell size and cells experienced an enlargement up to 60% with respect to control (Fig. 1B).

Since differences in cellular volume among cells exposed to the different treatments were observed, the other cell parameters analysed by FCM in the present study were expressed corrected by the FS signal thereby avoiding fluorescence variability due to differences in relative cell volume or in the intracellular concentration of the fluorochrome.

FCM analyses based on red fluorescence wavelength (FL4) showed that exposure to the three compounds modified the emission of the chlorophyll *a* fluorescence. The UV filter BP-3 caused a significant ( $p < 0.05$ ) increase in cell autofluorescence (Fig. 1A), whereas the disinfectant TCS caused a significant ( $p < 0.05$ ) decrease up to 26% in the autofluorescence with respect to control cultures (Fig. 1B). With regard to the fragrance, cells exposed to AHTN experienced a slight increase in the FL4 signal but this was not statistically significant ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1C).

### 3.2. Growth and metabolic activity

Growth data analysis showed that the treatment with TCS and AHTN induced a noticeable inhibitory effect on the cellular division of *T. suecica* in a concentration-dependent manner, which resulted in significantly ( $p < 0.05$ ) lower growth rates in all cultures, except to those exposed to the lowest concentrations assayed. Cultures exposed to the highest concentrations assayed of TCS and AHTN ( $16$  and  $2.4 \text{ pg cell}^{-1}$ , respectively) showed a decrease of 83% and 70% in growth rate, respectively (Fig. 2B and C). These compounds have a negative effect on growth; however, cells exposed to high concentrations of BP-3 showed a significantly ( $p < 0.05$ ) increase of 65% in growth rate (Fig. 2A).

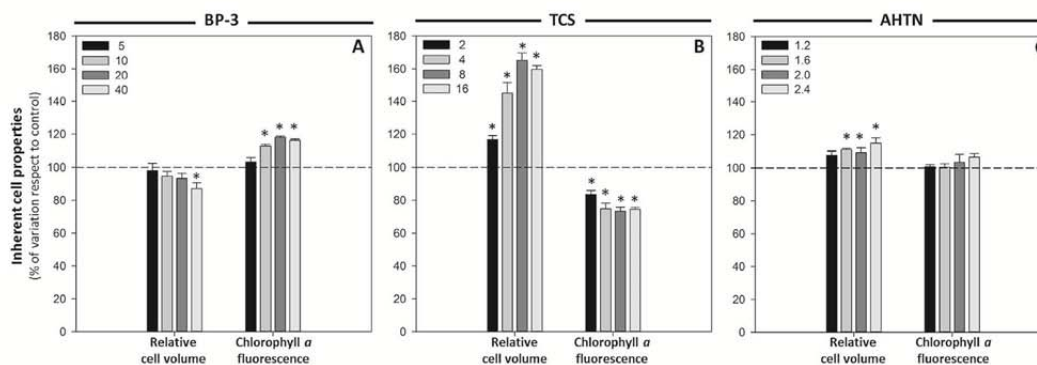
The metabolic vigour of the cells was studied measuring the

metabolic activity after 24 h of exposure to the PCPs using the fluorescein diacetate (FDA) cytometric assay. In the case of TCS, the fluorescent signal intensity emitted by cells, proportional to the accumulated fluorescein and correlated with the esterase activity, was strongly diminished. It was already significantly reduced ( $p < 0.05$ ) in cultures exposed to the lowest disinfectant concentration and this reduction was more pronounced when the TCS concentration increased, reaching a reduction of 73% in the activity compared to control cultures at the highest TCS concentration assayed (Fig. 2B). Also AHTN exposure caused a remarkable loss of fluorescence intensity which means a significant ( $p < 0.05$ ) lower metabolic activity in all treated cultures except in cultures exposed to the lowest fragrance concentration ( $1.2 \text{ pg cell}^{-1}$ ) (Fig. 2C). However, BP-3 had the opposite effect and cells exposed to this UV filter accumulated more fluorescein with respect to control cells, which means a more pronounced metabolic activity. Cultures exposed to  $20 \text{ pg cell}^{-1}$  and  $40 \text{ pg cell}^{-1}$  of BP-3 exhibited significant ( $p < 0.05$ ) increases in esterase activity of around 1.5- and 2.5-fold, respectively, with respect to control cultures (Fig. 2A).

### 3.3. Cytoplasmic membrane properties

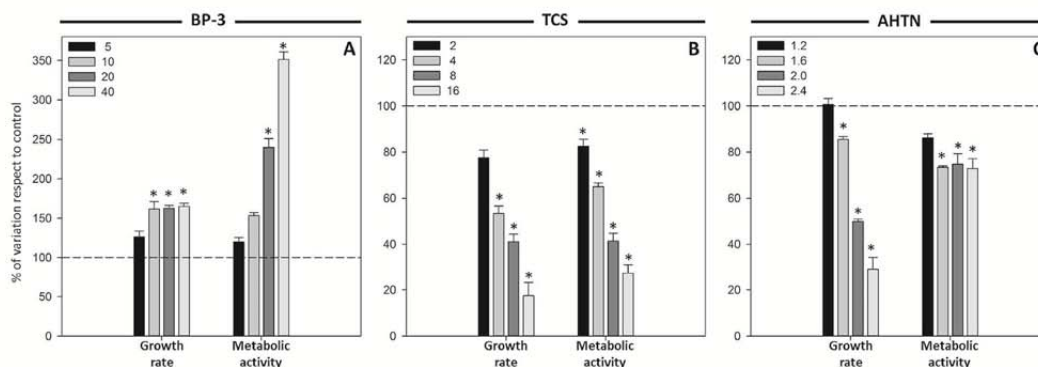
Membrane integrity and potential are two essential membrane properties. A FCM assay based on dye exclusion of the probe PI was used to identify viable cells with intact plasma membrane (PI<sup>-</sup>). Cell viability in *T. suecica* cultures exposed to the three PCPs tested was not significantly ( $p < 0.05$ ) affected by the addition of these compounds to the medium. After 24 h of exposure, the percentage of PI cells remained close to 100% for both control and exposed cultures. None of the PCPs assayed, even at the highest concentration tested, affected cell viability (Fig. 3A, B, C).

Nevertheless, treated cultures showed remarkable alterations on cytoplasmic membrane potential. On the one hand, cultures treated with the UV filter BP-3 and the fragrance AHTN showed a significant ( $p < 0.05$ ) increase in green fluorescence emission as a result of an additional influx of the dye into the cell, which indicates a membrane depolarization. Cells exposed to the highest concentrations of BP-3 and AHTN showed an increased DiBAC<sub>4</sub>(3)-derived fluorescence of 1.4- and 0.3-fold, respectively, with respect to control cells (Fig. 3A, C). On the other hand, TCS-exposed cultures exhibited a decrease in 70% of the green fluorescence emission with respect to control cultures, indicating cell hyperpolarization (Fig. 3B).

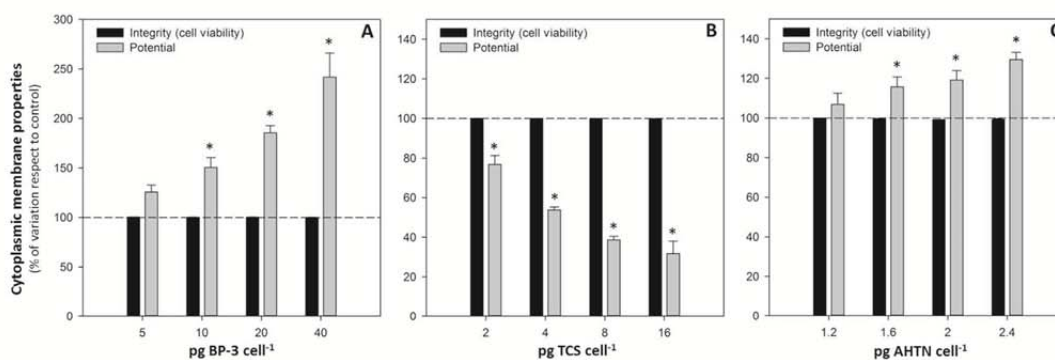


**Fig. 1.** Variations in inherent cell properties of *T. suecica* cells exposed to different concentrations, expressed as cellular quota ( $\text{pg cell}^{-1}$ ), of BP-3 (A), TCS (B) and AHTN (C) for 24 h. Results are shown as percentage of variation of cell volume and chlorophyll *a* fluorescence with respect to control (for which a value of 100 is assigned, indicated by the dashed line). Significant differences with respect to control at a significance level of 0.05 ( $p < 0.05$ ) are represented by an asterisk (\*).





**Fig. 2.** Variations in growth and metabolic activity of *T. suecica* cells exposed to different concentrations, expressed as cellular quota ( $\text{pg cell}^{-1}$ ), of BP-3 (A), TCS (B) and AHTN (C) for 24 h. Results are shown as percentage of variation of growth rate and metabolic activity with respect to control (for which a value of 100 is assigned, indicated by the dashed line). Significant differences with respect to control at a significance level of 0.05 ( $p < 0.05$ ) are represented by an asterisk (\*).



**Fig. 3.** Alterations on cytoplasmic membrane properties of *T. suecica* cells exposed to different concentrations, expressed as cellular quota ( $\text{pg cell}^{-1}$ ), of BP-3 (A), TCS (B) and AHTN (C) for 24 h. Results are shown as percentage of variation of membrane integrity and potential with respect to control (for which a value of 100 is assigned, indicated by the dashed line). Significant differences with respect to control at a significance level of 0.05 ( $p < 0.05$ ) are represented by an asterisk (\*).

#### 4. Discussion

Several physicochemical analyses have confirmed the presence of PCPs in all the different aquatic compartments (Ortiz de García et al., 2013; Pintado-Herrera et al., 2013; Rodil et al., 2012). The three compounds tested are highly lipophilic ( $\log K_{ow}$  4–6), which makes these compounds critical for bioaccumulation (Muir and Howard, 2006). However, there are no data about their ecotoxicity, in particular, data on marine microalgal species.

Obtained results showed that the three tested PCPs caused physiological alterations on the marine microalga *T. suecica* after 24 h of exposure; however, cell viability remains close to 100% for all the chemicals tested. Potential metabolic adjustments or stimulation of the antioxidant defence mechanism could be involved in this maintenance (Esperanza et al., 2015b). Cell viability endpoint could be time-exposure dependent. Therefore, the toxicological parameters evaluated can be considered as early effects because cell viability was not affected.

Taking into account the cellular quota used for the assays (fixed in function of their effect on growth after 96 h), AHTN was the most toxic compound, followed by TCS and then, by BP-3, since AHTN showed significant alterations on the parameters analysed at much

lower concentrations. The expression “toxic cellular quota” was already introduced by Moreno-Garrido et al. (2000) and tries to be an approach to a better unification of literature data by eliminating the effect of cellular density. It provides an easier way to standardize protocols through the use of a single expression containing the values for contaminant concentration and cell density, the two main factors studied in marine toxicity tests. Toxicity values which consider the contaminant that corresponds to each organism in terms of cellular content are more interesting than calculated values of  $EC_{50}$  (Debelius et al., 2009).

Based on the observed cytotoxic response, the tested compounds could be classified into two groups related to their different toxic effects on this microalgal species: BP-3 in one group and TCS and AHTN in another group.

BP-3 exposed cultures showed an increase in their growth rate that could be interpreted as a first response to fight against the stress, correlating well with cellular esterase activity results, which showed a significant ( $p < 0.05$ ) increase of the activity in a concentration-dependent manner (Fig. 2A). This enzyme activity stimulation may be a result of a general metabolic stimulation induced by the toxic agent in the microalgal cells in order to adapt their physiology to adverse environmental conditions. Stimulation

of this enzyme activity has also been reported in microalgae exposed to other pollutants such as paraquat or copper (Prado et al., 2009; Lage et al., 2001). As a result of the increase in growth rate and metabolic activity, a decrease in cell size of treated cells was detected (Fig. 1A), since these cells were able to complete their cell cycle and to divide faster than control cells. Relative to cytoplasmic membrane potential, a significant ( $p < 0.05$ ) depolarization was observed (Fig. 3A). Uptake of the fluorophore DiBAC<sub>4</sub>(3) is indicative of disturbance of the membrane such as inhibition of pump/leak balance, blockage of channels or generation of ionic leaks, evidencing metabolic perturbations and environmental stress (Lloyd et al., 2004). Furthermore, an increase in chlorophyll *a* fluorescence in cells exposed to the UV filter was also detected (Fig. 1A). Changes in the *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence of green algae can be used as a tool to detect negative alterations on photosynthesis and to reveal response mechanisms, to quantify stress responses and to identify certain contaminants (Prado et al., 2011; Chalifour et al., 2009; Bi Fai et al., 2007; Ekelund and Aronson, 2007; González-Barreiro et al., 2004; Cid et al., 1995). Sunscreens have a marked lipophilic character, so they tend to be accumulated in solid matrices such as sediments and also to be bioaccumulated in living organisms. These compounds act by absorbing ultraviolet radiation; they captured incident energy and emitted it again as heat, so it can be expected to affect the photosynthetic properties of microalgae. The observed increase in chlorophyll fluorescence suggests a decrease in the photosynthetic efficiency of cells exposed to the UV filter due to damage in the photosynthetic apparatus (Maxwell and Johnson, 2000).

Several studies evaluated BP-3 toxicity on microalgae, but they only considered growth inhibition for the assessment of phytotoxic effects (Tovar-Sánchez et al., 2013; Sieratowicz et al., 2011; Rodil et al., 2009). Paredes et al. (2014) evaluated the ecotoxicological effects of four UV filters using marine organisms from different trophic levels, and the marine microalga *I. galbana* was the most affected species, being BP-3 the most toxic compound even at very low concentrations. Furthermore, the results for risk quotient showed that there was a potential threat to the coastal environments caused by this type of chemicals. In the case of sunscreens, their presence is particularly strong in coastal waters where aquatic recreational activities were carried out.

As indicated above, *T. suecica* cultures exposed to TCS or AHTN showed a similar pattern of cytotoxicity, showing differences only for one of the examined parameters. Both compounds provoked a significant ( $p < 0.05$ ) increase in volume, more pronounced in the case of TCS-exposed cells, probably due to the incapacity to finish cell division as evidenced by growth data (Fig. 2B and C). Growth rate and metabolic activity significantly ( $p < 0.05$ ) decreased in cultures exposed to both pollutants (Fig. 2B and C). The decrease in esterase activity could indicate that these compounds cause redox imbalances or alterations in protein synthesis and, therefore, a general decrease in cellular activity. Previous studies (Seoane et al., 2014) showed a reduction of the esterase activity in *T. suecica* cells exposed to antibiotics. Moreover, cells exposed to TCS also showed a decrease in autofluorescence (Fig. 1B). Chlorophyll *a* fluorescence is a function of the cell pigment content and the photochemical activity of PSII in the photosynthetic electron transport chain (Franklin et al., 2001). Therefore, this autofluorescence decrease can be related to oxidative damage to PSII, to a decrease in pigment content or to chlorophyll bleaching as a consequence of the production of reactive oxygen species (Ekmekci and Terzioglu, 2005). Despite these cytotoxicity similarities described, AHTN and TCS provoked significant ( $p < 0.05$ ) alterations of the cytoplasmic membrane potential, but in a different way (Fig. 3B and C): AHTN provoked a reduction of the cytoplasmic membrane potential (an increasing depolarization level reflected by increased DiBAC<sub>4</sub>(3)-

derived fluorescence) while TCS provoked an increase of this potential (hyperpolarization reflected by decreased DiBAC<sub>4</sub>(3)-derived fluorescence). These results indicate that the induced damage to the plasma membrane begins with changes on the permeability properties before the disruption of the membrane integrity. Further studies on lipid peroxidation could elucidate the effects on cell membranes since many pollutants cause a significant increase in reactive oxygen species (Esperanza et al., 2016; Cid et al., 1996). Cellular membranes are selective, dynamic barriers that play an essential role in regulating biochemical and physiological events (Cid et al., 1996). These alterations of the membrane permeability properties could lead to osmotic changes and failures in the regulatory cell volume control process, which, in turn, explain the increase in cell size observed (Fig. 1B and C).

TCS is a widely used antimicrobial agent typically designed to kill or to inhibit the growth of a wide range of “undesirable” microbial species, thus it could have significant impacts on natural biotic communities (Wilson et al., 2003). Several studies have shown the toxicity of TCS on different aquatic organisms, including sludge organisms, algae, invertebrates and fish (Ciniglia et al., 2005; Dann and Hontela, 2011; Fritsch et al., 2013; Orvos et al., 2002; Riva et al., 2012; Yang et al., 2008). Among these organisms, microalgae were the most sensitive to TCS, but significant differences in sensitivity were found among species (Tatarazako et al., 2004; Orvos et al., 2002), hence TCS may address multiple target sites to a different extent in the different species (Franz et al., 2008). In bacteria, TCS has been described to block the lipid synthesis by inhibiting the enzyme enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI) (Levy et al., 1999; McMurry et al., 1998). This enzyme (also isolated in microalgae) acts completing the cycle of fatty acid elongation (Zheng et al., 2013). Additionally, other modes of action involved in its toxic effect were identified, such as the destabilisation of cell membranes due to interactions of TCS with phospholipids (Villalain et al., 2001). This causes structural perturbations provoking the loss of permeability-barrier functions (Phan and Marquis, 2006), which correlates well with the results obtained in this study. Moreover, TCS exposure led to the uncoupling of oxidative phosphorylation in microalgae (Franz et al., 2008).

There are scarce data about toxicity of AHTN on microalgal species but it was shown that this compound affects algae growth (Ortiz de García et al., 2013; Santiago-Morales et al., 2012). It was also shown that AHTN causes growth inhibition on the freshwater mussel *Lampsilis cardium* (Gooding et al., 2006) and a remarkable oxidative stress in the earthworm *Eisenia fetida* (Chen et al., 2011).

Current toxicity bioassays with microalgae used mainly integrative endpoints such as growth. Standardised algal growth bioassays remain the preferred technique for the assessment of phytotoxic effects in most ecotoxicological studies, but these tests provide bulk measurements which do not allow us to observe potential intercellular differences within the cellular population analysed (Prado et al., 2011). Moreover, this conventional endpoint does not provide information about the physiological causes that can result in growth inhibition, i.e., do not offer information regarding the toxic mechanisms by which environmental chemicals disrupt biological processes in algal cells (Nestler et al., 2012). FCM allows studying different morphological and physiological properties of single cells, being a useful tool in toxicity tests with microalgae (Cid et al., 1996; Franqueira et al., 2000; Prado et al., 2012). In the present work, the response of *T. suecica* cells to three PCPs was characterized using FCM to analyse their effects on different inherent cell properties and cell physiological status based on metabolic activity and membrane stability. Through the use of fluorescence dyes that are specific for distinct biochemical properties, FCM can be used to study interferences with specific metabolic processes and to diagnose modes of action (Adler et al., 2007;

Staubert et al., 2002). In addition, these endpoints were helpful as early indicators of exposure to the PCPs because they could detect alterations on the microalgal physiology before viability or growth were affected.

The use of chlorophyll fluorescence as an endpoint in common monoalgal toxicity assays has been described in several studies (Brack and Frank, 1998; Geoffroy et al., 2007). Since fluorescence emission of photosynthetic organisms changes continuously following their adaptation to the changing environment, environmental stressors such as contaminants affect the function of photosynthetic systems, thereby affecting the fluorescence emission. Furthermore, chlorophyll *a* fluorescence would be a good and fast biomarker because no commercial fluorochrome is necessary to analyse this microalgal inherent property. Prado et al. (2011) showed that the study of the chlorophyll *a* fluorescence by FCM in *C. moewussii* cells exposed to the herbicide paraquat was useful to characterize chlorotic populations of cells, with a drastic reduction of chlorophyll. However, in this study, the most sensitive parameters were esterase activity and cytoplasmic membrane potential. Although FDA has been, and still is, commonly used as a probe for cell viability, it may also indicate cellular metabolic activity. Enzyme inhibition measurements in microalgae are popular indicators of environmental stress. Esterase activity, in particular, has been proven useful in a variety of cell types (Breeuwer et al., 1995; Humphreys et al., 1994) and has been shown to relate well to general metabolic activity (Regel et al., 2002). Bentley-Mowat (1982) first reported that the intensity of fluorescence derived from the cleavage of FDA appeared to depend on the “metabolic vigour” of the cells. In this way, FDA assay is not only helpful to discriminate between “healthy” and “stressed” cells, but also to quantify subtle responses to environmental impacts (Prado et al., 2009; Seoane et al., 2014). Cytometric quantification of cellular fluorescence upon cleavage of FDA is a sensitive and rapid technique to assess phytoplankton metabolic activity (Jochem, 1999). This parameter has been proven useful to assess the toxicity of different pollutants on microalgae such as herbicides (Esperanza et al., 2015b; Prado et al., 2009) or heavy metals (Cid et al., 1996). Furthermore, the advantage of cytometric measurements over fluorescence microscopy or bulk estimates by fluorometry lies in the assessment of minor changes in metabolic activity by the detection of changes in the fluorescence intensity exhibited on a single-cell basis (Jochem, 1999). Cytoplasmic membrane potential has also proved to be very sensitive. Fluorochrome-based measurements of plasma membrane potential provide a useful approach for the monitoring of cellular stress in *T. suecica* as it has been previously shown for other organisms (Dinsdale et al., 1995; Mason et al., 1994; Lloyd et al., 2004; Prado et al., 2012). The use of the fluorochrome DiBAC<sub>4</sub>(3) in this study showed that the tested PCPs damage microalgal plasma membrane, mainly by permeabilisation rather than by disruption of membrane integrity. And it can be concluded that depolarized cells were not necessarily non-viable cells as previously shown by Prado et al. (2012). Microbial plasma membrane is the chemiosmotic barrier that provides the interface between the organism and its external environment; therefore, cytoplasmic membrane potential reports on the current transport and energy status of the cell (Konrad and Hedrich, 2008).

To sum up, results obtained in this work confirm the potential use of the assayed protocols for the prospective assessment of the potential cytotoxicity of these emerging pollutants.

## 5. Conclusions

Although after 24 h of exposure none of the PCPs assayed affected cell viability, at least at the assayed concentrations, *T. suecica* cells showed significant alterations on the other

parameters analysed. Diverse cell responses to the different pollutants were observed. On the one hand, the disinfectant TCS and the fragrance AHTN provoked a decrease in growth and metabolic activity. On the other hand, cells cultured in the presence of the UV-filter BP-3 showed a stimulation of their activity that could be a first response to the stress in order to adapt their physiology to adverse environmental conditions. Treated cells also showed highly relevant alterations in cytoplasmic membrane potential and changes in autofluorescence. Chlorophyll *a* fluorescence would be a good biomarker because no commercial fluorochrome is necessary to analyse this microalgal inherent property. But among the different subcellular endpoints assessed in this study, esterase activity and membrane potential constituted the most sensitive parameters. It can be concluded that the toxicological model used and the toxicological parameters evaluated are suitable to assess the toxicity of these emerging contaminants.

## Acknowledgements

M.S. and M.E. acknowledge their pre-doctoral fellowship from Xunta de Galicia (Spain). Authors would like to thank the anonymous reviewers whose comments improved the manuscript.

## References

- Adler, N.E., Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., 2007. Flow cytometry as a tool to study phytotoxic modes of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 297–306.
- Bentley-Mowat, J.A., 1982. Application of fluorescence microscopy to pollution studies on marine phytoplankton. *Bot. Mar.* 25, 203–204.
- Berglund, D.L., Eversman, S., 1988. Flow cytometric measurements of pollutant stresses on algal cells. *Cytometry* 9, 150–155.
- Bi Fai, P., Grant, A., Reid, B., 2007. Chlorophyll *a* fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1520–1531.
- Brack, W., Frank, H., 1998. Chlorophyll *a* fluorescence: a tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40, 34–41.
- Brausch, J.M., Rand, G.M., 2011. A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* 82, 1518–1532.
- Breeuwer, P., Drocourt, J.L., Bunschoten, N., Zwietering, M.H., Rombouts, F.M., Abee, T., 1995. Characterisation of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1614–1619.
- Chalifour, A., Spear, P.A., Boily, M.H., DeBlois, C., Giroux, I., Dassylva, N., Juneau, P., 2009. Assessment of toxic effects of pesticide extracts on different green algal species by using chlorophyll *a* fluorescence. *Toxicol. Environ. Chem.* 91, 1315–1329.
- Chen, C., Xue, S., Zhou, Q., Xie, X., 2011. Multilevel ecotoxicity assessment of polycyclic musk in the earthworm *Eisenia fetida* using traditional and molecular endpoints. *Ecotoxicology* 20, 1949–1958.
- Cid, A., Herrero, C., Torres, E., Abalde, J., 1995. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquat. Toxicol.* 31, 165–174.
- Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C., Abalde, J., 1996. Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry. *Cytometry* 25, 32–36.
- Cinglia, C., Cascone, C., Lo Giudice, R., Pinto, G., Pollio, A., 2005. Application of methods for assessing the geno- and cytotoxicity of Triclosan to *C. ehrenbergii*. *J. Hazard. Mater.* 122, 227–232.
- Dai, G., Huang, J., Chen, W., Wang, B., Yu, G., Deng, S., 2014. Major pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in wastewater treatment plant and receiving water in Beijing, China, and associated ecological risks. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 92, 655–661.
- Dann, A.B., Hontela, A., 2011. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *J. Appl. Toxicol.* 31, 285–311.
- Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of Subtle Change? *Environ. Health Perspect.* 107, 907–938.
- Debelius, B., Forja, J.M., DelValls, A., Lubián, L.M., 2009. Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1503–1513.
- DeLorenzo, M.E., Fleming, J., 2008. Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals and personal care products on the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 203–210.
- Dinsdale, M.G., Lloyd, D., Jarvis, B., 1995. Yeast vitality during cider fermentation: two approaches to the measurement of membrane potential. *J. Inst. Brew.* 101,

- 453–458.
- 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.
- Ekelund, N.G.A., Aronson, K.A., 2007. Changes in chlorophyll a fluorescence in *Euglena gracilis* and *Chlamydomonas reinhardtii* after exposure to wood-ash. *Environ. Exp. Bot.* 59, 92–98.
- Ekmekci, Y., Terzioğlu, S., 2005. Effects of oxidative stress induced by paraquat on wild and cultivated wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.* 83, 69–71.
- Esperanza, M., Cid, A., Herrero, C., Rioboo, C., 2015a. Acute effects of a prooxidant herbicide on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: screening cytotoxicity and genotoxicity endpoints. *Aquat. Toxicol.* 165, 210–221.
- Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2015b. *Chlamydomonas reinhardtii* cells adjust the metabolism to maintain viability in response to atrazine stress. *Aquat. Toxicol.* 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. *Sci. Total Environ.* 554–555, 237–245.
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Lim, R.P., 2001. Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 160–170.
- Franqueira, D., Orosa, M., Torres, E., 2000. Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. *Sci. Total Environ.* 247, 119–126.
- Franz, S., Altenburger, R., Heilmeyer, H., Schmitt-Jansen, M., 2008. What contributes to the sensitivity of microalgae to triclosan? *Aquat. Toxicol.* 90, 102–108.
- Fritsch, E.B., Connon, R.E., Werner, I., Davies, R.E.U.E., Beggel, S., Feng, W., Pessah, I.N., 2013. Triclosan impairs swimming behavior and alters expression of Excitation Contraction coupling proteins in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.* 47, 2008–2017.
- García-Jares, C., Llopart, M., Polo, M., Salgado, C., Macías, S., Cela, R., 2002. Optimisation of a solid-phase microextraction method for synthetic musk compounds in water. *J. Chromatogr. A* 963, 277–285.
- 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*. *Aquat. Toxicol.* 83, 149–158.
- Gimeno, R.A., Marce, R.M., Borrull, F., 2004. Determination of organic contaminants in coastal water. *TrAC Trends Anal. Chem.* 23, 341–350.
- Giokas, D.L., Salvador, A., Chisvert, A., 2007. UV filters: from sunscreens to human body and the environment. *TrAC Trends Anal. Chem.* 26, 360–374.
- González-Barreiro, O., Rioboo, C., Cid, A., Herrero, C., 2004. Atrazine-induced chlorosis in *Synechococcus elongatus* cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 301–307.
- Gooding, M.P., Newton, T.J., Bartsch, M.R., Hornbuckle, K.C., 2006. Toxicity of synthetic musks to early life stages of the freshwater mussel *Lampsilis cardium*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 549–558.
- Herrero, C., Cid, A., Fabregas, J., Abalde, J., 1991. Yields in biomass and chemical constituent of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquac. Eng.* 10, 99–110.
- Humphreys, M.J., Allman, R., Lloyd, D., 1994. Determination of the viability of *Trichomonas vaginalis* using flow cytometry. *Cytometry* 15, 343–348.
- Jochem, F.J., 1999. Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with fluorescein diacetate. *Mar. Biol.* 135, 721–728.
- Konrad, K.R., Hedrich, R., 2008. The use of voltage-sensitive dyes to monitor signal-induced changes in membrane potential-ABA triggered membrane depolarization in guard cells. *Plant J.* 55, 161–173.
- Lage, O.M., Sansonetti, 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.
- Levy, C.W., Roujeinikova, A., Sedelnikova, S., Baker, P.J., Stuitje, A.R., Slabas, A.R., Rice, D.W., Rafferty, J.B., 1999. Molecular basis of triclosan activity. *Nature* 398, 383–384.
- Lloyd, D., Harris, J.C., Biagini, G.A., Hughes, M.R., Maroulis, S., Bernard, C., Wadley, R.B., Edwards, M.R., 2004. The plasma membrane of microaerophilic protists: oxidative and nitrosative stress. *Microbiology* 150, 1183–1190.
- Mason, D.J., Allman, R., Stark, J.M., Lloyd, D., 1994. Rapid estimation of bacterial antibiotic susceptibility with flow cytometry. *J. Microsc.* 176, 8–16.
- Maxwell, K., Johnson, G., 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668.
- McMurry, L.M., Oethinger, M., Levy, S.B., 1998. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* 394, 531–532.
- Moreno-Garrido, I., Lubian, L.M., Soares, M., 2000. Influence of cellular density on determination of EC<sub>50</sub> in microalgal growth inhibition tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47, 112–116.
- Muir, D.C., Howard, P.H., 2006. Are there other persistent organic pollutants? A challenge for environmental chemists. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7157–7166.
- Naidu, R., Jit, J., Kennedy, B., Arias, V., 2016. Emerging contaminant uncertainties and policy: the chicken or the egg conundrum. *Chemosphere* 154, 385–390.
- Nestler, H., Groh, K.J., Schönenberger, R., Behra, R., Schirmer, K., Eggen, R.L.L., Suter, M.J.F., 2012. Multiple-endpoint assay provides a detailed mechanistic view of responses to herbicide exposure in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 110–111, 214–224.
- NORMAN. Network of reference laboratories for monitoring of emerging environmental pollutants.** [www.norman-network.net](http://www.norman-network.net).
- Ortiz de García, S., Pinto, G., García-Encina, P., Irusta, R., 2013. Consumption and occurrence of pharmaceutical and personal care products in the aquatic environment in Spain. *Sci. Total Environ.* 444, 451–465.
- Orvos, D., Versteeg, D., Inauen, J., Capdevielle, M., Rothenstein, A., Cunningham, V., 2002. Aquatic toxicity of triclosan. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1338–1349.
- Paredes, E., Perez, S., Rodil, R., Quintana, J.B., Beiras, R., 2014. Ecotoxicological evaluation of four UV filters using marine organisms from different trophic levels *Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus*, and *Siriella armata*. *Chemosphere* 104, 44–50.
- Peck, A.M., 2006. Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 907–939.
- Phan, T.N., Marquis, R.E., 2006. Triclosan inhibition of membrane enzymes and glycolysis of *Streptococcus mutans* in suspensions and biofilms. *Can. J. Microbiol.* 52, 977–983.
- Pintado-Herrera, M.G., González-Mazo, E., Lara-Martín, P.A., 2013. Environmentally friendly analysis of emerging contaminants by pressurized hot water extraction-stir bar sorptive extraction-derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 401–411.
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Abalde, J., Cid, A., 2009. Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat. *Environ. Int.* 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. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 114, 117–125.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2011. Characterization of cell response in *Chlamydomonas moewusii* cultures exposed to the herbicide paraquat: induction of chlorosis. *Aquat. Toxicol.* 102, 10–17.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2012. Screening acute cytotoxicity biomarkers using a microalga as test organism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 86, 219–226.
- Rabinovitch, P.S., June, C.H., 1990. Intracellular ionized calcium, membrane potential, and pH. In: Ormerod, M.G. (Ed.), *Flow Cytometry. A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 161–185.
- Regel, R.H., Ferris, J.M., Gan, G.G., Brookes, J.D., 2002. Algal esterase activity as a bioassay of environmental degradation in a freshwater creek. *Aquat. Toxicol.* 59, 209–223.
- Rioboo, C., O'Connor, J.E., Prado, R., Herrero, C., Cid, A., 2009. Cell proliferation alterations in *Chlorella* cells under stress conditions. *Aquat. Toxicol.* 94, 229–237.
- Riva, C., Cristoni, S., Binelli, A., 2012. Effects of triclosan in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*: a proteomic investigation. *Aquat. Toxicol.* 118–119, 62–71.
- Rodil, R., Moeder, M., Altenburger, R., Schmitt-Jansen, M., 2009. Photostability and phytotoxicity of selected sunscreen agents and their degradation mixtures in water. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 1513–1524.
- Rodil, R., Quintana, J.B., Concha-Graña, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., 2012. Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). *Chemosphere* 86, 1040–1049.
- Sánchez-Avila, J., Tauler, R., Lacorte, S., 2012. Organic micropollutants in coastal waters from NW Mediterranean Sea: sources distribution and potential risk. *Environ. Int.* 46, 50–62.
- Santiago-Morales, J., Gómez, M.J., Herrera, S., Fernández-Alba, A.R., García-Calvo, E., Rosal, R., 2012. Oxidative and photochemical processes for the removal of galaxolide and tonalide from wastewater. *Water Res.* 46, 4435–4447.
- Sauvé, S., Desrosiers, M., 2014. A review of what is an emerging contaminant. *Chem. Cent. J.* 8 (15), 1–7.
- Shapiro, H.M., 1995. *Practical Flow Cytometry*, third ed. Wiley-Liss Inc., New York, p. 542.
- Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2014. Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kütz.) Butch. *Mar. Environ. Res.* 101, 1–7.
- Sieratowicz, A., Kaiser, D., Behr, M., Oetken, M., Oehlmann, J., 2011. Acute and chronic toxicity of four frequently used UV filter substances for *Desmodesmus subspicatus* and *Daphnia magna*. *J. Environ. Sci. Health, Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 46, 1311–1319.
- Singer, H., Müller, S., Tixier, C., Pillonel, L., 2002. Triclosan: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment. Field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4998–5004.
- Stauber, J.L., Franklin, N.M., Adams, M.S., 2002. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. *Trends Biotechnol.* 20, 141–143.
- Sumner, N.R., Guitart, C., Fuentes, G., Readman, J.W., 2010. Inputs and distributions of synthetic musk fragrances in an estuarine and coastal environment; a case study. *Environ. Pollut.* 158, 215–222.
- Tatarazako, N., Ishibashi, H., Teshima, K., Kishi, K., Arizono, K., 2004. Effects of triclosan on various aquatic organisms. *Environ. Sci. Technol.* 38, 133–140.
- Tovar-Sánchez, A., Sánchez-Quiles, D., Basterretxea, G., Benedé, J.L., Chisvert, A., Salvador, A., Moreno-Garrido, I., Blasco, J., 2013. Sunscreen products as emerging pollutants to coastal waters. *PLoS One* 8, e65451.
- Villalain, J., Mateo, C.R., Aranda, F.J., Shapiro, S., Micó, V., 2001. Membranotropic effects of the antibacterial agent triclosan. *Arch. Biochem. Biophys.* 390, 128–136.

- Wilson, B.A., Smith, V.H., Denoyelles Jr., F., Larive, C.K., 2003. Effects of three pharmaceutical and personal care products on natural freshwater algal assemblages. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1713–1719.
- Wolff, C., Fuks, B., Chatelain, P., 2003. Comparative study of membrane potential-sensitive fluorescent probes and their use in ion channel screening assays. *J. Biomol. Screen* 8, 533–543.
- Yang, L., Ying, G., Su, H., 2008. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1201–1208.
- Zheng, M., Liang, K., Wang, B., Sun, X., Yue, Y., Wan, W., Zheng, L., 2013. Isolation and characterization of an enoyl-acyl carrier protein reductase gene from microalga *Isochrysis galbana*. *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 31, 398–406.



## **5. DISCUSIÓN**

---





Las zonas costeras presentan un gran problema de contaminación y deterioro ambiental debido a los impactos consecuencia de la actividad humana. El litoral costero es un área de gran desarrollo con un elevado crecimiento poblacional, turístico e industrial que ha ocasionado la alteración de las condiciones ambientales originarias, afectando de manera especial la calidad de las aguas. Éstas se han convertido en depósitos de aguas residuales donde el equilibrio biológico natural puede verse seriamente alterado.

Los ecosistemas marinos son ecosistemas ricos y complejos, pero a la vez frágiles y vulnerables a cualquier perturbación. Las zonas costeras como rías, estuarios, bahías o marismas suelen ser zonas de cultivo o de protección de gran número de especies acuáticas, muchas de ellas de interés comercial o ecológico. Además, al presentar una circulación más restringida de sus aguas, ante cualquier suceso de contaminación, puntual o crónico, se van a ver más afectadas que un sistema de aguas abiertas.

A pesar de que las normativas europeas y estatales (Directiva 91/271/CEE; Real Decreto-ley 11/1995) establecen la necesidad de depurar las aguas residuales urbanas, gran parte de los contaminantes emergentes alcanzan los ecosistemas marinos a través de los efluentes de las EDAR. A algunas depuradoras españolas llegan aguas residuales en las que se han detectado concentraciones de fármacos de hasta  $53,2 \mu\text{g L}^{-1}$  (Afonso-Olivares et al., 2017). Un volumen importante de estas aguas no tratadas o con un deficiente grado de depuración es vertido a las zonas costeras por el incorrecto funcionamiento de las EDAR, las cuales no están adaptadas o renovadas para ser capaces de eliminar estos compuestos de los influentes. Otros contaminantes emergentes, como los filtros solares y demás PCPs, pueden entrar en el medio ambiente marino también de un modo directo, alcanzándose, en temporada estival, concentraciones de filtros solares de hasta  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  en el agua superficial de algunas playas de la costa mediterránea española (Tarazona et al., 2010). Al ser liberados continuamente, los efectos negativos de los contaminantes emergentes son

independientes de su persistencia en el medio. Además, en muchos casos, su modo de acción toxicológico es desconocido o sólo conocido en humanos.

El incremento de la producción y el uso de sustancias potencialmente tóxicas y la actuación del medio marino como sumidero de muchas de ellas ha hecho que sea de especial interés realizar estudios de calidad ambiental para poder valorar los efectos de tales productos, no sólo sobre el hombre, sino también sobre otros organismos vivos y los ecosistemas.

La mayoría de los datos de ecotoxicidad en el medio acuático, se obtienen utilizando organismos dulceacuícolas de referencia, específicos de aguas continentales. La principal diferencia entre el medio dulceacuícola y el marino se encuentra en el mayor grado de dilución de los ambientes marinos, razón por la que la concentración en el mar de muchos contaminantes suele ser más baja que en aguas continentales. Además, es importante considerar que las características del agua de mar pueden influenciar el comportamiento de los contaminantes. Elaborar normas de calidad ambiental para los ecosistemas marinos a partir de los resultados ecotoxicológicos que aportan los organismos de aguas continentales no es inadecuado como primer paso. Sin embargo, el progreso y el conocimiento que se ha desarrollado en los últimos años, relativo a la toxicidad en el medio marino, ha fomentado la inquietud por revisar los estándares de calidad sustentados en bases de datos más adecuadas para este medio.

La sensibilidad de los distintos organismos es específica de la especie y depende del compuesto, por lo que no es predecible y no existe un grupo universal de organismos sensibles de ensayo cuya toxicidad pueda servir como sustituto de los datos toxicológicos en microorganismos marinos. El Anexo V de la Directiva Marco del Agua (Directiva 2000/60/CE) propone que, a la hora de elaborar las normas de calidad del agua, no hay que limitarse a obtener datos de los taxones especificados, sino que cuantos más resultados se tengan de toxicidad, con mayor seguridad se estarán estableciendo normas de calidad ambiental.

Las microalgas son los principales productores primarios de los ambientes acuáticos y, debido a su posición ecológica, cualquier agente químico que altere la

comunidad fitoplanctónica y/o su producción primaria puede provocar desequilibrios en niveles tróficos superiores, generando graves consecuencias en los ecosistemas (Campanella et al., 2001; Rioboo et al., 2007). Además, al presentar ciclos de vida tan cortos, pueden responder rápidamente a los cambios ambientales y su diversidad y densidad pueden indicar la calidad de su hábitat. En consecuencia, los ensayos con distintas microalgas son necesarios para evaluar el potencial impacto de los contaminantes que pueden introducirse en el medio ambiente marino. Sin embargo, estos microorganismos siguen estando poco representados como organismos de ensayo en los métodos estandarizados y normalmente recomendados. Por todo ello, es necesario introducir especies microalgales nuevas que puedan ser utilizadas en bioensayos de ecotoxicidad, de modo que en cada caso se pueda elegir el método más apropiado, teniendo en cuenta la naturaleza del medio acuático que se pretende proteger y los organismos que habitan naturalmente en dicho medio, para que el sentido ecológico de los ensayos realizados sea cada vez mayor.

El objetivo principal de los estudios ecotoxicológicos se centra en valorar el efecto de los contaminantes sobre los seres vivos y determinar qué niveles son admisibles o permisibles y qué niveles causarían daños, estableciendo las concentraciones de los contaminantes a las que éste es inocuo, puesto que se considera que para todo producto tóxico hay una concentración por debajo de la cual éste deja de tener efectos nocivos (Hapke, 1981; Abel y Axiak, 1991; Rand, 1995). En la práctica, es difícil establecer estas cantidades umbrales y, de hecho, a medida que las técnicas de medida se han hecho más precisas, estas concentraciones "inocuas" son cada vez más bajas. Sin embargo, conocer las concentraciones a las que un producto no es dañino, buscando las concentraciones aceptables de los compuestos en el medio ambiente, no proporciona demasiada información ya que no podemos asegurar que, aun regulando los vertidos, nunca se superen estas concentraciones. Por lo que no habría que limitarse a establecer las concentraciones de inocuidad, sino que se deberían indicar los peligros y las consecuencias derivadas de la simple presencia de

estos contaminantes en el medio ambiente y del potencial incremento en su concentración.

### **ALTERACIÓN DEL CRECIMIENTO**

En los últimos años se han desarrollado bioensayos con nuevos parámetros y métodos cada vez más rápidos, sencillos, prácticos y sensibles para la detección de contaminantes y el estudio de su toxicidad. Sin embargo, la medida del crecimiento microalgal sigue siendo el parámetro más utilizado para estudiar los efectos de los compuestos sobre estos microorganismos en los ensayos de toxicidad crónicos, en los que la toxicidad se mide en función de la reducción de la tasa de crecimiento o de la biomasa final, en relación a un control (Debelius et al., 2008; Nie et al., 2009; González-Naranjo y Boltes, 2014; Giraldo et al., 2017).

Los resultados obtenidos en el presente estudio reflejan que los contaminantes emergentes ensayados ejercen un efecto negativo sobre el crecimiento de la microalga marina *Tetraselmis suecica*. Dicho efecto es dependiente de la concentración, de modo que se hace más evidente cuanto mayor es la concentración del contaminante en el medio de cultivo. Sólo en el caso del antibiótico OTC, se detectó una estimulación del crecimiento en las células expuestas a la concentración más baja ensayada ( $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ ). La estimulación del crecimiento observada se puede explicar como un intento de las células microalgales para adaptarse y resistir los efectos negativos de dicho contaminante. Este fenómeno, conocido como hormesis, es común en presencia de antibióticos y se han observado resultados similares en otras microalgas expuestas a antibióticos (Liu et al., 2012). Bajas concentraciones de OTC pueden inducir un estrés oxidativo todavía tolerable por las células, que conduciría a un incremento en el metabolismo celular y la activación de factores de crecimiento y mecanismos antioxidantes, principalmente enzimas implicadas en la destoxificación (Tosello et al., 2008).

Entre los diferentes índices que se pueden utilizar para evaluar el efecto de los contaminantes sobre el crecimiento microalgal, el valor de la  $EC_{50}$  es el más común. Es utilizado en los ensayos de toxicidad para la comparación de resultados obtenidos bajo

diferentes condiciones en diferentes laboratorios (Leboulanger et al., 2001). En este trabajo se consideró también expresar la concentración de contaminante ensayada en términos de cuota celular, es decir, cantidad de compuesto por célula. Es una manera fácil de estandarizar protocolos y unificar la bibliografía mediante el uso de una sola expresión que contiene los valores de concentración de contaminante y densidad celular, dos factores fundamentales a tener en cuenta en los ensayos de toxicidad. Por lo que los estudios que consideran el contaminante que corresponde a cada organismo en términos de contenido celular serían más útiles para la comparación de resultados entre laboratorios (Debelius et al., 2009). Además, da una aproximación más cercana a la realidad ya que, aunque las concentraciones de los contaminantes utilizadas en los bioensayos de toxicidad en laboratorio suelen ser más elevadas que las concentraciones detectadas en el medio ambiente, la densidad celular con la que se trabaja en estos bioensayos también es mucho más elevada que la podríamos encontrar en los ecosistemas naturales.

**Tabla 3.** Valores de  $EC_{50}$  para el crecimiento obtenidos tras 96 h de exposición a los contaminantes emergentes ensayados, pertenecientes a los distintos grupos: antibióticos, inhibidores de la bomba de protones (PPI), filtros ultravioleta, conservantes y fragancias. Los resultados se expresan en concentración de contaminante por volumen de medio de cultivo ( $mg L^{-1}$ ) y en concentración de contaminante por célula o cuota celular ( $ng célula^{-1}$ ).

Contaminantes emergentes	Fármacos				Productos de cuidado e higiene personal (PCPs)		
	Antibióticos			PPI	Filtro UV	Conservante	Fragancia
Grupo							
Compuesto	CLO	FLO	OTC	OMP	BP-3	TCS	AHTN
$EC_{50}$ ( $mg L^{-1}$ )	11,16	9,03	17,25	125,33	0,98	0,38	0,10
$EC_{50}$ ( $ng célula^{-1}$ )	0,22	0,18	0,35	2,50	0,02	0,008	0,002

Para evaluar los potenciales efectos tóxicos de los contaminantes emergentes sobre la microalga *T. suecica* se llevaron a cabo bioensayos de inhibición del crecimiento de 96 h en los que las células se expusieron a distintas concentraciones de cada compuesto. Estos ensayos se realizaron con el fin de seleccionar las concentraciones subletales que se utilizarían para realizar un estudio más detallado a nivel citómico, calculando la EC<sub>50</sub> para el crecimiento tras 96 h de exposición a los diferentes compuestos (Tabla 3).

Teniendo en cuenta estos resultados, la toxicidad de los contaminantes ensayados en *T. suecica*, en orden creciente en base al efecto sobre el crecimiento sería: OMP < OTC < CLO < FLO < BP-3 < TCS < AHTN. Siendo la fragancia AHTN el compuesto más tóxico, puesto que se necesita una concentración mucho menor que con el resto de compuestos ensayados para provocar una disminución del crecimiento microalgal del 50 % con respecto a los cultivos control. En general, atendiendo al grupo de contaminante utilizado, los PCPs resultaron ser mucho más tóxicos para esta microalga que los fármacos; y dentro de los fármacos, los antibióticos mostraron mayor toxicidad que el OMP.

Para ciertos contaminantes aquí ensayados, los valores de EC<sub>50</sub> a tiempos cortos de exposición (24 h) no han podido ser calculados o han resultado ser significativamente superiores a los valores obtenidos para tiempos de exposición más largos, indicando un menor efecto tóxico en el crecimiento durante las primeras horas de exposición. Por lo tanto, el crecimiento no siempre es un parámetro útil para evaluar la toxicidad aguda ya que, como se ha visto en el capítulo I, en el caso de los antibióticos no se detectaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento tras 24 h de exposición, mientras que el resto de los parámetros evaluados, como el tamaño, autofluorescencia y vitalidad celular, sí se vieron alterados. Otros contaminantes ensayados, a dosis subletales, producen en primer lugar una estimulación del crecimiento, como se ha observado en el incremento de la tasa de crecimiento y la actividad esterasa de las células expuestas a la BP-3 tras 24 h de exposición (capítulo

III). Este filtro UV causó una estimulación metabólica general como respuesta temprana de adaptación de las células a las condiciones ambientales adversas.

La mayoría de los ensayos de toxicidad estandarizados con microalgas evalúan los efectos en el crecimiento a lo largo de las varias generaciones que se producen durante las 72 o 96 h de exposición. Una de las razones por las cuales los ensayos de toxicidad se llevan a cabo en periodos de 72 o 96 h es que tiempos de exposición mayores pueden provocar una disminución de la toxicidad del agente por evaporación o degradación (Walsh y Merrill, 1984). Tras este período de tiempo, las células expuestas a concentraciones subletales, si solamente se ha visto inhibido el crecimiento de la población, podrían crecer recuperándose rápidamente la densidad del cultivo. Pero además de la inhibición o estimulación del crecimiento, las microalgas exhiben distintas respuestas a los tóxicos como cambios morfológicos y fisiológicos. Por lo que resulta de mayor relevancia determinar las distintas alteraciones que se puedan producir en estos microorganismos fitoplanctónicos a corto plazo y que puedan afectar a su producción primaria, aunque no se detecte un descenso notable en su crecimiento o viabilidad.

Los ensayos de toxicidad basados en la inhibición del crecimiento de las microalgas han sido utilizados para el estudio del impacto ambiental de diversos contaminantes en los sistemas acuáticos (Adler et al., 2007; Bi Fai et al., 2007). De hecho, los datos obtenidos en estos ensayos se utilizan en la evaluación del riesgo ecológico para el establecimiento de directrices para la descarga de efluentes contaminantes (Nancharaiah et al., 2007). Sin embargo, otra de las limitaciones que presentan estos ensayos es que la inhibición del crecimiento es un parámetro poblacional, que refleja un valor medio de la población estudiada sin tener en cuenta la respuesta que se produce a nivel celular (Geoffroy et al., 2007). Es decir, que el efecto negativo detectado de los distintos contaminantes emergentes sobre el crecimiento microalgal, es el resultado de una serie de efectos sobre diversos parámetros fisiológicos a nivel de la célula individual, que no pueden analizarse a nivel poblacional.

Los cambios ambientales afectan directamente a las células, antes de que se manifieste el efecto sobre la población, por lo que resulta conveniente la medida de parámetros a nivel de las células individuales. La CMF se caracteriza por ser una técnica rápida capaz de analizar miles de células por segundo y que permite un análisis multiparamétrico de células individuales en suspensión. Por lo tanto, una de las ventajas de esta técnica, radica precisamente en que permite llevar a cabo la medida de parámetros a nivel de la célula, posibilitando el estudio tanto de propiedades inherentes (tamaño y complejidad celular, y autofluorescencia, como en el caso de los organismos fotosintéticos como las microalgas), como de diversos componentes celulares y procesos metabólicos mediante el uso de marcadores fluorescentes (Cid et al., 1995, 1996, 1997; Jochem, 2000).

Mientras que con los ensayos estandarizados de inhibición del crecimiento microalgal son necesarias 72-96 h para obtener resultados, la CMF proporciona información a muy corto plazo, casi inmediata, de la toxicidad aguda en las células microalgales expuestas a concentraciones subletales, elucidando las potenciales alteraciones fisiológicas celulares que se producen antes de poder observar cambios en la densidad o viabilidad celular. Por ello, en este estudio, se llevaron a cabo ensayos de 24 h en los que las células se expusieron a concentraciones subletales de los distintos contaminantes emergentes y se realizó un estudio profundo a nivel citómico mediante CMF, buscando parámetros de respuesta rápidos y sensibles para el análisis de las alteraciones que se producen a corto plazo a nivel celular. Esto nos permite agilizar la obtención de datos biológicos para la evaluación del riesgo que conlleva la liberación al ambiente de dichos contaminantes. Además, hoy en día existen citómetros de flujo de pequeño tamaño, fácilmente portables, como los fabricados por *CytoBuoy*, que permiten el seguimiento *in situ* de la dinámica de los ecosistemas acuáticos y con los que se podrían realizar estos estudios ambientales para la evaluación de la calidad del agua.



**CAMBIOS EN LA VIABILIDAD Y VITALIDAD CELULAR**

Otro de los inconvenientes de los bioensayos de toxicidad basados en la inhibición del crecimiento microalgal es la incapacidad para distinguir entre células vivas y muertas (Nancharaiah et al., 2007). En los últimos años, la CMF se ha utilizado cada vez más en estudios ambientales para caracterizar los efectos que la exposición a diversos factores de estrés tiene en los microorganismos (Lage et al., 2001; Adler et al., 2007). Una de las características que distingue a las células no viables de las células viables es la pérdida de la funcionalidad e incluso la integridad estructural de la membrana plasmática celular. Por ello, se han desarrollado diversos métodos para evaluar la viabilidad celular basados precisamente en los cambios que se producen en las propiedades de la membrana cuando la célula muere. Uno de los métodos más utilizados se basa en el uso de la CMF o la microscopía de fluorescencia en combinación con fluorocromos ADN-específicos que son excluidos por las células viables, cuya membrana está intacta, permitiendo una tinción selectiva de las células no viables, con la membrana dañada (Darzynkiewicz, 1994). Dentro de este tipo de fluorocromos, el más utilizado es el yoduro de propidio (IP) que ha sido el fluorocromo utilizado en este estudio para determinar la viabilidad celular de las células de *T. suecica* expuestas a los contaminantes emergentes.

Se ha observado que tras 24 h de exposición, los contaminantes utilizados, a las concentraciones ensayadas, no producen pérdida de viabilidad celular en los cultivos microalgales. La viabilidad celular podría depender del tiempo de exposición al contaminante, pero en el caso de los antibióticos, éstos tampoco produjeron un descenso de la viabilidad tras 96 h de exposición. Este hecho puede deberse a la existencia de mecanismos de defensa o sistemas de detoxificación basados en la estimulación de determinadas enzimas antioxidantes y otros mecanismos no enzimáticos (Dewez et al., 2005; Chankova et al., 2014). Pero a pesar de que las células continúan viables y no han perdido la integridad de la membrana plasmática, sí se detectaron cambios en el resto de parámetros evaluados, por lo que éstos proporcionan información útil acerca de la toxicidad aguda en las microalgas expuestas

a concentraciones subletales, elucidando las potenciales alteraciones fisiológicas celulares que se producen antes de poder observar cambios en la densidad o viabilidad celular.

Únicamente en el caso del OMP (capítulo II) se detectó la aparición de una pequeña subpoblación no viable en los cultivos expuestos 24 h a las dos concentraciones más altas ensayadas (2,4 y 2,8 ng cell<sup>-1</sup>). Es posible que el estrés oxidativo generado por el OMP sea el responsable de la mortalidad celular detectada, ya que el elevado nivel de ROS generado en las células se ha relacionado con la iniciación de daños en las membranas celulares y otros componentes de la célula, como la peroxidación lipídica (Chagas et al., 2008). Muchos compuestos ejercen su efecto tóxico a través de mecanismos mediados por el estrés oxidativo (Palmer et al., 2002; Suntres, 2002; Lu et al., 2006; Perla et al., 2008) y se sabe que éste puede conducir en última instancia a la muerte celular (Li et al., 2004; Vamanu et al., 2008). Se ha observado que otros contaminantes que también generan estrés oxidativo en la célula como el cobre, el cloro o el herbicida paraquat, también provocan una reducción de viabilidad celular en microalgas (Cid et al., 1996; Lage et al., 2001; Stauber et al., 2002; Nancharaiah et al., 2007; Prado et al., 2011). Las concentraciones más bajas de OMP utilizadas causaron un menor estrés oxidativo, que podría estimular los mecanismos de defensa antioxidantes (Vega et al., 2005; Chagas et al., 2008; Liu et al., 2009), por lo que en estos cultivos no se detectaron diferencias significativas en la viabilidad. Ante elevados niveles de estrés oxidativo, estos mecanismos resultarían insuficientes y se producirían daños irreversibles en las células como consecuencia de los altos niveles de ROS generados (Hess, 2000).

Muchos de los estudios ambientales realizados con CMF para caracterizar los efectos de distintos factores de estrés sobre las microalgas se han centrado en la discriminación de células viables y no viables dentro de la población expuesta a las condiciones citotóxicas. Sin embargo, en este estudio podemos comprobar que la integridad de la membrana citoplasmática se ve afectada sólo después de que otros parámetros celulares ya hayan sido dañados de un modo notable. Podemos concluir,

por tanto, que existen otros parámetros más sensibles que pueden proporcionar información a muy corto plazo sobre las potenciales alteraciones fisiológicas que se producen en las microalgas y que puedan afectar a su producción primaria antes de que se detecte un descenso significativo de la viabilidad celular.

Además de los ensayos de viabilidad centrados en la permeabilidad de la membrana plasmática también se utilizan con frecuencia, como indicadores del estrés ambiental, las medidas de la inhibición de determinadas enzimas, puesto que permiten obtener resultados de manera rápida y sensible (Peterson y Stauber, 1996, Blaise y Ménard, 1998, Prado et al., 2012). Concretamente, la actividad esterasa se relaciona con la actividad metabólica general o vitalidad celular, dado que estas enzimas son esenciales para el funcionamiento normal de la célula. La actividad esterasa se ha utilizado desde hace años para estimar la actividad microbiana en suelos (Schnürer y Rosswall, 1982), aguas (Holzapfel-Pschorn et al., 1987, Tadonlélé et al., 2009) y sedimentos marinos (Gumprecht et al., 1995) y es un indicador útil para el estudio de la actividad metabólica de microalgas (Gilbert et al., 1992, Jochem, 2000, Prado et al., 2012). En particular, la actividad esterasa en algas ha resultado ser sensible en la detección de alteraciones ambientales mínimas como cambios en la temperatura, luz, salinidad, turbulencia o nutrientes (Geary et al., 1997, Jochem, 1999; Brookes et al., 2000; Regel et al., 2004).

En este estudio, para el análisis de la actividad metabólica de las células de *T. suecica* expuestas a los contaminantes emergentes, se realizó un análisis de la actividad esterasa inespecífica basado en la generación de fluorescencia derivada de la hidrólisis enzimática del FDA. Pudiendo distinguir, por CMF, entre células fluorescentes metabólicamente activas y células no fluorescentes metabólicamente no activas. La fluoresceína se acumula en el interior de las células activas, por lo que la actividad metabólica celular se ha medido analizando la intensidad de la señal fluorescente emitida y comparando las diferencias entre la fluorescencia emitida por las células metabólicamente activas, lo que nos permite detectar pequeños cambios en la actividad metabólica o vitalidad celular. La detección mediante CMF de la

fluorescencia de la fluoresceína resultante de la hidrólisis del FDA se ha aplicado para la determinación de la toxicidad de diversos agentes contaminantes, como metales pesados (Lage et al., 2001) y pesticidas (Gilbert et al., 1992, Prado et al., 2012) en diversas especies fitoplanctónicas.

La medición de la actividad metabólica ha sido uno de los parámetros más sensibles en este estudio para evaluar la respuesta de las células de *T. suecica* a los distintos contaminantes emergentes. La respuesta citotóxica varía en función del contaminante estudiado ya que, a corto plazo, se ha detectado que algunos compuestos producen un aumento o estimulación de la actividad esterasa, mientras que otros producen una disminución de dicha actividad.

La población viable expuesta al OMP (capítulo II) y las células expuestas a la BP-3 (capítulo III), mostraron un incremento de la actividad esterasa que puede deberse a una estimulación metabólica general de las células inducida por el agente tóxico, con el fin de adaptar su fisiología a las condiciones ambientales adversas. Este incremento puede estar relacionado con la activación de procesos de detoxificación, como mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo, en los que participan estas enzimas. Se ha visto que la exposición a concentraciones subletales o exposiciones cortas a ciertos contaminantes inducen una estimulación de la fluorescencia derivada de la hidrólisis del FDA, dicha estimulación de la actividad esterasa celular puede deberse a que estas enzimas son esenciales para la sustitución de los fosfolípidos en las membranas celulares (Franklin et al., 2001).

En las células expuestas al TCS, AHTN (capítulo III) y a los tres antibióticos ensayados (capítulo I), se produjo un descenso en la actividad metabólica. La reducción de la actividad esterasa se ha observado en otros estudios, tanto en microalgas como en cianobacterias, bajo distintas condiciones de estrés ambiental (Regel et al., 2002; Sobrino et al., 2005; Durrieu et al., 2006). Se ha demostrado que la exposición de diversas especies de microalgas a elevadas concentraciones de cobre, un metal que tiene una reconocida capacidad para generar especies reactivas de oxígeno, induce una reducción de la actividad esterasa dependiente de la concentración y del tiempo

de exposición (Franklin et al., 2001; Yu et al., 2007; Hadjoudja et al., 2009). Los contaminantes ensayados en este estudio podrían inducir un estrés oxidativo y la superproducción de ROS, provocando alteraciones en la propia estructura de las enzimas o causando su degradación oxidativa, lo que conllevaría un descenso general de la actividad metabólica celular. En el caso de los antibióticos, como se ha comentado anteriormente, la toxicidad puede deberse al origen bacteriano de las mitocondrias, lo que las convierte en potenciales dianas de estos fármacos. Este hecho provocaría la inhibición de la síntesis de proteínas mitocondriales, especialmente las relacionadas con el transporte electrónico, esenciales para el correcto metabolismo y proceso de respiración celular. Por este motivo se altera el estado fisiológico celular y disminuye la actividad metabólica, sin alterarse la integridad de la membrana o viabilidad.

Comparando los resultados obtenidos en este ensayo con los resultados de viabilidad celular, podemos observar que la actividad esterasa demuestra ser un parámetro mucho más sensible, ya que tiene una relación directa con la actividad metabólica general y permite discriminar, tras períodos muy breves de exposición a los contaminantes, entre células sanas y estresadas, cuantificando respuestas sutiles frente a los impactos ambientales. Aunque con ambos ensayos podemos distinguir entre células que tienen su membrana intacta (viables) y células que han perdido la integridad de su membrana (no viables), con el ensayo del FDA podemos distinguir además las células que no han perdido la integridad de su membrana pero que sí se ven afectadas a nivel de su metabolismo y no presentan actividad esterasa (Jochem, 2000; Prado et al., 2009a). Las células con fluorescencia de la fluoresceína y, por tanto, metabólicamente activas son siempre viables; sin embargo, las células no fluorescentes y metabólicamente inactivas pueden ser células no viables, con alteraciones en la membrana plasmática que impiden la retención de la fluoresceína en el interior celular, pero también células viables sin actividad esterasa (Jochem, 2000). A la vista de los resultados, se podría concluir que las células se inactivan antes de que tenga lugar la verdadera muerte celular, como ya se había indicado en otros artículos de este grupo (Prado et al., 2011).

### ALTERACIÓN DE LA FOTOSÍNTESIS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

La medida de parámetros relacionados con la autofluorescencia natural de las microalgas ha permitido el desarrollo de métodos simples, rápidos y sensibles para detectar efectos fotoinhibidores de los contaminantes ambientales. Los organismos fototróficos poseen autofluorescencia natural debido a los pigmentos que poseen, lo que permite un análisis no invasivo, sin necesidad de marcadores fluorescentes externos. El uso de la autofluorescencia celular como parámetro indicador en los ensayos de toxicidad en microalgas ya se ha descrito en otros estudios (Geoffroy et al., 2007).

La clorofila constituye un indicador de la capacidad fotosintética del organismo (Eullaffroy y Vernet, 2003). El PSII es el componente del aparato fotosintético donde se genera la mayor parte de la emisión *in vivo* de la fluorescencia de la clorofila *a*, de modo que cualquier daño que se produzca en este fotosistema provocará un descenso de la emisión de fluorescencia detectada por el citómetro de flujo (Sobrino et al., 2005). De hecho, los cambios en la fluorescencia de la clorofila *a* se han utilizado para estudiar el estado fisiológico de células microalgales sometidas a diferentes factores de estrés (González-Barreiro et al., 2004; Sobrino et al., 2004; Ekelund y Aronson, 2007; Chalifour et al., 2009; Hadjoudja et al., 2009).

En este estudio, la medida de los parámetros relacionados con la fotosíntesis han resultado ser muy sensibles. El AHTN, como se ha visto en el capítulo III, fue el único contaminante emergente utilizado en el que no se detectaron diferencias significativas en la autofluorescencia celular de las células expuestas con respecto al control. En todos los casos, para evitar variabilidad en los datos debido a las diferencias detectadas en el volumen celular, los resultados se interpretaron como la relación entre la fluorescencia de la clorofila *a* (FL4) y el tamaño celular (FS).

Para los tres antibióticos ensayados (CLO, FLO y OTC), se detectó un descenso en el contenido celular de clorofila *a* (capítulo I). Este efecto se relaciona con el origen endosimbiótico de los cloroplastos, puesto que, debido a las similitudes existentes entre el ARN ribosomal de bacterias y cloroplastos, los ribosomas de los cloroplastos

pueden ser sensibles a los antibióticos (Gray, 1992; McFadden y Roos, 1999). Las proteínas del aparato fotosintético son sintetizadas en los cloroplastos (Mayfield et al., 1995) y daños en sus ribosomas podrían afectar la síntesis de clorofila (Liu et al., 2012). Algunos estudios muestran la existencia de una relación lineal entre la concentración celular de clorofila *a* y la fluorescencia (Galbraith et al., 1988; Graziano et al., 1996; Veldhuis y Kraay, 2000). Sin embargo, en este caso, a pesar del descenso del contenido en pigmentos observado, se detectó un aumento de la fluorescencia de la clorofila *a*. Esto se traduce en una disminución de la eficiencia fotosintética que podría explicarse por un bloqueo de la cadena de transporte electrónico a nivel del PSII, debido a la inactivación de algunos centros de reacción (Cid et al., 1995)

La BP-3 es un filtro solar orgánico que absorbe la radiación UV, capta la energía incidente y la reemite nuevamente como radiación térmica. Por lo que es interesante el estudio de las propiedades fotosintéticas de las microalgas expuestas a este contaminante emergente. Frente a este contaminante (capítulo III), las células mostraron también un aumento de la autofluorescencia que se relaciona con un descenso en la fotosíntesis debido a alteraciones en el aparato fotosintético. En condiciones óptimas, la mayor parte de la energía lumínica absorbida por la clorofila es disipada vía conversión química, con una pequeña proporción dedicada a la emisión de fluorescencia y calor, pero debido al estrés provocado por estos contaminantes, la capacidad fotosintética puede verse reducida, dando lugar a un incremento de la emisión de fluorescencia.

En el caso del OMP, el descenso de la autofluorescencia detectado sí se relaciona con la disminución en el contenido celular de clorofila *a* (capítulo II). Este contaminante también generó una elevada cantidad de ROS en las células de *T. suecica*, que podrían estar relacionadas con la disminución del contenido en pigmentos e implicadas en los daños oxidativos a nivel del PSII. Las ROS son compuestos muy reactivos que pueden causar, entre otros daños, una degradación o “blanqueamiento” de la clorofila (Ekmekci y Terzioglu, 2005; Eullaffroy et al., 2009). La ruptura oxidativa

de la clorofila puede explicar la pérdida de autofluorescencia en los cultivos expuestos a concentraciones crecientes de OMP.

Por último, el TCS provocó un descenso de la autofluorescencia de las células expuestas que también se puede relacionar con daños oxidativos del PSII, descenso del contenido en pigmentos o al blanqueamiento de la clorofila debido a la acción de ROS (capítulo III).

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que los parámetros relacionados con la fotosíntesis, como la fluorescencia de la clorofila *a* detectada por CMF, son parámetros sensibles y pueden ser utilizados como una buena alternativa al crecimiento (Petersen y Kusk, 2000). Dado que la emisión de fluorescencia de los organismos fotosintéticos cambia continuamente después de su adaptación al entorno cambiante, diversos factores de estrés ambientales como la exposición a contaminantes, afectan la función de los sistemas fotosintéticos, alterándose la emisión de la fluorescencia. Además, la fluorescencia de la clorofila *a*, al ser una propiedad inherente de las células microalgales, presenta como ventaja evidente el ser un biomarcador eficaz, rápido y de bajo coste debido a que no es necesario la utilización de un fluorocromo comercial. La autofluorescencia ya ha demostrado ser un biomarcador útil para evaluar la toxicidad de metales pesados o herbicidas (Cid et al., 1995, 1997; di Toppi et al., 2005; Prado et al., 2011; Esperanza et al., 2016) y, como hemos visto en los distintos capítulos del presente estudio, de distintos grupos de contaminantes emergentes.

Las microalgas actúan como productores primarios en los ecosistemas acuáticos, por lo que el equilibrio ecológico puede ser fácilmente dañado si la fotosíntesis se ve afectada por la alteración del medio. Se ha visto que contaminantes como el herbicida atrazina afectan la fotosíntesis de las microalgas provocando un descenso en el contenido en pigmentos como resultado del estrés oxidativo que generan (Esperanza et al., 2016). Sin embargo, a concentraciones subletales, las células se mantienen viables ya que cambian su metabolismo fotótrofo a un metabolismo heterótrofo, por lo que el aumento de ciertos contaminantes en los



sistemas acuáticos podría conducir a una disminución en la fijación de CO<sub>2</sub> (Esperanza et al., 2015). Por ello, la medida de parámetros relacionados con la actividad fotosintética resulta importante para monitorizar la degradación medioambiental de los ecosistemas marinos (Endo y Omasa, 2004) y debe ser uno de los biomarcadores principales en ecotoxicología o toxicología medioambiental (Schreiber et al., 2007).

### **ALTERACIONES ESTRUCTURALES**

La exposición de las células microalgales a agentes contaminantes puede inducir también alteraciones en la morfología celular, tanto en lo que se refiere al volumen como a la forma de las células. Además de las medidas de autofluorescencia ya comentadas, la CMF permite la medida de la luz dispersada por la célula, que se puede utilizar para obtener criterios cuantitativos de la apariencia celular, que a su vez es buena indicadora de las propiedades celulares (Ohnuma et al., 2006). Por lo tanto, el tamaño o volumen celular, es una característica inherente a la célula que se puede analizar mediante CMF ya que es proporcional a la cantidad de luz dispersada en el ángulo anterior o *forward scatter light* (FS).

Los tres antibióticos ensayados en este estudio causaron un descenso en el tamaño celular que puede relacionarse con la inhibición del crecimiento y el descenso en contenido en pigmentos observado (capítulo I). Las células activas, antes de dividirse, aumentan su tamaño debido al incremento en orgánulos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y otras moléculas. Sin embargo, las células expuestas a antibióticos no experimentaron este aumento de volumen, ya que como se ha comentado, estos compuestos podrían inhibir la síntesis de proteínas de mitocondrias y cloroplastos y, consecuentemente, la síntesis de clorofila de las células microalgales debido al origen bacteriano de estos orgánulos, convirtiéndolos en potenciales dianas de los antibióticos.

En el caso de la BP-3, también se detectó una disminución en el tamaño celular con respecto a las células control tras 24 h de exposición (capítulo III). Pero en este caso, el descenso en el tamaño puede atribuirse al hecho de que las células tratadas con BP-3 son capaces de completar el ciclo celular y dividirse más rápidamente que las

células no expuestas, como resultado del incremento en la tasa de crecimiento y la actividad metabólica, como se ha detallado en el capítulo III.

Por otro lado, el TCS, OMP y, en menor medida, el AHTN (capítulos II y III), causaron un aumento del tamaño o volumen celular que puede deberse a la incapacidad de las células de completar el ciclo celular y finalizar la división, como se refleja en el descenso de la tasa de crecimiento de las células expuestas con respecto a las células de los cultivos control. Las células expuestas no serían capaces de completar el proceso de división a pesar de haber aumentado su tamaño o incluso duplicar sus componentes, algo que ya se ha propuesto para explicar el incremento de volumen celular en diferentes especies de microalgas sometidas a diversos factores de estrés, tanto físicos (Sobrino et al., 2004) como químicos (González-Barreiro et al., 2004; Geoffroy et al., 2007; Vallotton et al., 2008). Además, las alteraciones provocadas por estos contaminantes en el potencial de membrana citoplasmático pueden dar lugar a cambios osmóticos y fallos en los procesos de control del volumen celular, debido a un flujo alterado de agua e iones a través de la membrana, que expliquen también el aumento del tamaño.

La complejidad intracelular es otra de las características morfológicas de la célula que puede ser estudiada mediante CMF, puesto que se relaciona con la luz dispersada en el ángulo lateral o *side scatter light* (SS). En las células expuestas a OMP se detectó un incremento de la complejidad intracelular con respecto a los cultivos control (capítulo II). Este incremento posiblemente se deba, por un lado, al hecho de que las células no han podido finalizar su división a pesar de haber aumentado de tamaño y duplicado sus componentes celulares y, por otro lado, a la degradación y desorganización de componentes celulares, como por ejemplo la degradación de pigmentos fotosintéticos, como consecuencia del estrés oxidativo inducido por el OMP (Suntres, 2002; González-Barreiro et al., 2004).

## EFFECTOS SOBRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA CITOPLASMÁTICO Y MITOCONDRIAL

Otro de los parámetros evaluados que ha mostrado alteraciones significativas, transcurridas solo 24 h de exposición a los contaminantes emergentes, ha sido el potencial de membrana citoplasmático. Las mediciones del potencial de la membrana plasmática, basadas en la fluorescencia de fluorocromos específicos, han demostrado ser útiles para la monitorización del estrés celular en diferentes organismos y especies de microalgas (Mason et al., 1994; Dinsdale et al., 1995; Lloyd et al., 2004; Prado et al., 2012). La membrana plasmática es una barrera quimiosmótica que, en el caso de microorganismos como las microalgas, constituye la superficie de contacto entre el organismo y el ambiente externo. A través de esta membrana, se mantiene un potencial electroquímico transmembrana (negativo en el interior de la célula) que juega un papel crítico en el control del intercambio de solutos, por lo que la medida de este parámetro informa sobre el transporte y estado energético de la célula (Konrad y Hedrich, 2008). En respuesta a determinados cambios en el ambiente circundante a la célula, se pueden producir alteraciones en el potencial eléctrico transmembrana. La monitorización de estas perturbaciones se considera un indicador sensible y rápido de la presencia de factores ambientales que pueden conducir a cambios fisiológicos en la célula y que pueden desembocar en citotoxicidad o incluso en muerte celular (Rabinovitch y June, 1990).

En este estudio el potencial de membrana citoplasmático ha sido otro de los parámetros de mayor sensibilidad, aunque la respuesta citotóxica también varía en función del contaminante ensayado. Las células expuestas a compuestos como la BP-3 y el AHTN mostraron un aumento de la fluorescencia, derivada de una mayor entrada del fluorocromo DiBAC<sub>4</sub>(3) en la célula, lo que indica una despolarización de la membrana plasmática (capítulo III). Alteraciones en bombas o canales transportadores que modifiquen el flujo de iones como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> o Ca<sup>+2</sup> a través de la membrana que delimita la célula, podrían explicar estos resultados ya que desencadenarían desequilibrios iónicos y de carga (Lloyd et al., 2004). La presencia de elevados niveles

de ROS, respuesta celular común a factores de estrés ambiental (Mittler, 2002; Valavanidis et al., 2006), también se ha relacionado con una reducción del potencial de membrana citoplasmático (Lloyd et al., 2000; Wei et al., 2008).

Las células expuestas a TCS y OMP mostraron el efecto contrario, ya que se observó una menor entrada del fluorocromo con respecto a las células control, indicando una hiperpolarización de la membrana plasmática (capítulos II y III). Estas alteraciones del potencial pueden dar lugar a cambios osmóticos y fallos en los procesos de control del volumen celular que expliquen el aumento significativo del tamaño celular detectado en los cultivos expuestos a estos dos compuestos.

En el caso del TCS, la acusada hiperpolarización observada podría asociarse a alguno de los mecanismos de acción conocidos de este compuesto, que implican la desestabilización de las membranas provocando la pérdida de sus funciones de barrera semipermeable (Villalain et al., 2001; Phan and Marquis, 2006). En otros estudios se ha detectado también una hiperpolarización inducida por TCS en células animales (Kawanai, 2001). La hiperpolarización de la membrana plasmática se asocia con el aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducida también por el TCS. El aumento en la concentración intracelular de este catión es una de las características comunes en el proceso de muerte celular inducida por algunos productos químicos citotóxicos (Harman y Maxwell, 1995; Verkhatsky, 2007; González-Pleiter et al., 2017).

En el caso del OMP, los cambios observados se asocian a su acción inhibitoria sobre las bombas de protones. Los cambios en el potencial se han relacionado a menudo con la inhibición de las bombas  $\text{H}^+$ -ATPasas o  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasas de la membrana, puesto que se consideran los principales generadores de los gradientes electroquímicos a través de la membrana plasmática (Bortner et al., 2001; Krol et al., 2003). En las células vegetales, el potencial de membrana citoplasmático se crea debido al transporte asimétrico de protones ( $\text{H}^+$ ) gracias a la actividad de bombas como las ATPasas que transportan  $\text{H}^+$  al exterior celular (en el caso de aquellas que están localizadas en la membrana plasmática) y al interior de la vacuola (en el caso de aquellas localizadas en el tonoplasto) (Palmgren et al., 2003; Pedersen, 2007). El

transporte iónico afecta a la distribución de la carga a través de la membrana y por tanto, a su voltaje. En otros estudios se ha comprobado que el OMP inhibe el crecimiento de *C. albicans* y *S. cerevisiae* y que varios PPI exhiben actividad antifúngica ya que estos compuestos pueden interactuar inadvertidamente con las H<sup>+</sup>/ATPasas presentes en estas especies (Monk et al., 1995). El acusado estrés oxidativo generado en las células expuestas al OMP también puede inhibir esta actividad enzimática y contribuir a los cambios en el potencial, ya que existen evidencias de la inhibición irreversible de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasas por la presencia de ROS (Wu-Hsiung et al., 1992).

El fluorocromo DiBAC<sub>4</sub>(3), utilizado para evaluar el potencial de membrana citoplasmático, se ha utilizado también en otros estudios como indicador de viabilidad, fundamentalmente en bacterias. En dichos estudios, las células que sufren alteraciones en su potencial de membrana y que por tanto, muestran una elevada fluorescencia como consecuencia de la entrada del fluorocromo, son consideradas células no viables (Jepras et al., 1995; Papadimitriou et al., 2006). Aunque el uso de fluorocromos sensibles al potencial de membrana citoplasmática como indicadores de viabilidad celular ha ido en aumento, es cuestionable si las células que muestran un potencial de membrana reducido son necesariamente células no viables (Breeuwer y Abee, 2000). En el presente estudio, se observa que los contaminantes emergentes ensayados provocan cambios en el potencial de membrana celular, mientras que los resultados obtenidos en el ensayo con IP indican que la viabilidad celular no se ve significativamente afectada. Podemos concluir que la exposición a los contaminantes emergentes daña la membrana plasmática de las células principalmente mediante cambios en sus propiedades de permeabilidad, más que por la disrupción de su integridad. Por lo que el estudio de las variaciones en dicho parámetro, al igual que el estudio de la actividad metabólica, resulta de gran utilidad para evaluar los efectos a corto plazo que se producen en las células expuestas a concentraciones subletales.

Después de estudiar los efectos producidos por los contaminantes emergentes en parámetros relacionados con la fotosíntesis y la actividad metabólica celular y las

alteraciones a nivel de la membrana plasmática, se han estudiado potenciales daños en otro orgánulo de gran importancia para la célula, la mitocondria. Durante la respiración aeróbica, el movimiento de electrones a través de la cadena de transporte electrónico genera un bombeo de protones de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana que se traduce en un gradiente electroquímico aprovechado por las ATPsintasas para generar ATP. Por lo que el potencial de membrana mitocondrial se relaciona con la capacidad de generar ATP mediante la fosforilación oxidativa y cambios en este potencial podrían alterar la producción de energía en la célula (Cossarizza y Salvioli, 2001; Poot y Pierce, 2001; Perry et al., 2011).

La tinción con el fluorocromo específico para mitocondrias JC-1 mostró un aumento significativo del potencial de membrana mitocondrial o hiperpolarización sólo en el caso de las células expuestas a las concentraciones más elevadas de OMP. La hiperpolarización mitocondrial se ha asociado a un aumento en la respiración, un incremento del flujo de electrones y una fosforilación oxidativa más activa (Weir et al., 2003; Hauser et al., 2006; Lin et al., 2006). También se ha asociado a un mayor estrés oxidativo ya que la mayor actividad mitocondrial puede favorecer la generación de ROS durante la fosforilación oxidativa, como subproducto del proceso de generación de ATP (Raha y Robinson, 2000; Møller, 2001; Loseva et al., 2004; Sweetlove y Foyer, 2004; Wallace, 2005; Huc et al., 2012). Esto se relaciona con los resultados obtenidos en las células expuestas a OMP, puesto que la población todavía viable experimentó un aumento de la actividad metabólica general y de los niveles intracelulares de ROS.

Los cambios observados en el potencial de membrana mitocondrial pueden deberse también al propio mecanismo de acción del OMP, que podría afectar a las bombas de protones de las microalgas, como las F-ATPasas, enzimas de la membrana interna mitocondrial utilizadas para la síntesis de ATP (Pedersen, 2007). En las células sometidas a algún tipo de estrés, el potencial de membrana mitocondrial puede alterarse por la desregulación de las cargas iónicas intracelulares. Cuando los flujos iónicos superan la capacidad de las mitocondrias para amortiguar estos cambios, estos potenciales o gradientes pueden colapsar, lo que lleva a un fallo en la producción de

ATP y a un estrés bioenergético (Perry et al., 2011). Por lo que la medida de este potencial y su regulación son determinantes clave de la salud o envejecimiento celular (Green et al., 2004; Nicholls, 2004). Los resultados obtenidos también podrían explicar los altos niveles de ROS producidos en células expuestas a OMP debido a que su producción por la cadena de transporte electrónica aumenta exponencialmente en células con una membrana mitocondrial fuertemente polarizada (Gerencser et al., 2012). Otros estudios han demostrado que la hiperpolarización de la membrana mitocondrial es un evento temprano en la apoptosis mediada por mitocondrias, inducida en diferentes tipos de células (Gergely et al., 2002, Giovannini et al., 2002, Leal et al., 2015).

En este estudio (capítulo II), sólo las células expuestas a las concentraciones más altas ensayadas de OMP, a las concentraciones más altas ensayadas, mostraron pequeñas alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial. Mientras que los demás parámetros estudiados mostraron diferencias significativas con respecto al control para el resto de contaminantes y a concentraciones más bajas. Por lo que el indicador utilizado podría no ser muy sensible en este caso o bien, la mitocondria no es el sitio de acción principal de los contaminantes emergentes ensayados. También se ha visto que en células vegetales, la mitocondria, aunque es particularmente sensible al daño oxidativo (Bartoli et al., 2004), posee elevados niveles de agentes antioxidantes en comparación con las células animales que podrían anular la citotoxicidad ejercida por los compuestos utilizados (Vicente et al., 2001).

### **ESTRÉS OXIDATIVO**

En los organismos fotosintéticos como las microalgas, las ROS se producen continuamente en cloroplastos y mitocondrias como subproductos en distintas vías metabólicas (Halliwell, 2006). Sin embargo, sus niveles pueden aumentar como respuesta a distintos factores de estrés abiótico como la presencia de contaminantes. Como las ROS son moléculas potencialmente muy tóxicas, sus niveles están estrictamente regulados por mecanismos de protección antioxidante para evitar daños en los componentes celulares (van Creveld et al., 2014). Debido a que tienen una vida

muy corta y concentraciones intracelulares muy bajas, su estudio requiere métodos muy rápidos y sensibles para la detección y la cuantificación. Por lo tanto, la CMF en combinación con fluorocromos específicos, es una técnica ideal para la caracterización de la generación de estas sustancias en la célula. La elección del fluorocromo depende de la especie reactiva de interés, de modo que la hidroetidina (HE) refleja preferentemente el nivel de ión superóxido, mientras que la dihidrorrodamina 123 (DHR 123) se relaciona con el peróxido de hidrógeno (Walrand et al., 2003, Wilhem et al., 2009).

Como se ha comentado, la cadena de transporte electrónico mitocondrial genera importantes cantidades de ROS durante la fosforilación oxidativa, (Møller, 2001, Raha y Robinson, 2000, Sweetlove y Foyer, 2004). Además del potencial papel de la mitocondria en el aumento de ROS en las células, las alteraciones detectadas en parámetros relacionados con el proceso fotosintético también podrían contribuir a su incremento. Los compuestos que afectan al PSII pueden provocar un aumento de los niveles de estrés oxidativo de las células debido a la superproducción de tripletes de clorofila (Rutherford y Krieger-Liszkay, 2001, Saladin et al., 2003). Este estrés oxidativo podría estar relacionado con la disminución en la fluorescencia de clorofila *a* debido al daño oxidativo del PSII o al blanqueamiento de este pigmento (Ekmekci y Terzioglu, 2005). La disminución de la eficiencia fotosintética producida por el contaminante podría también, a su vez, potenciar la producción de ROS en las células causando daños oxidativos y anomalías funcionales (Liu et al., 2012). La inhibición de la fotosíntesis puede conducir también a la activación del metabolismo heterotrófico microalgal para conseguir energía y poder mantener su viabilidad (Esperanza et al., 2015). Este cambio en el metabolismo podría provocar un aumento en la tasa de fotorrespiración, llevando a la producción de peróxido de hidrógeno en los peroxisomas microalgales (Cirulis et al., 2013).

La sobreproducción de ROS en células se relaciona a menudo con daños inespecíficos de los componentes celulares, conduciendo a una interrupción de procesos metabólicos cruciales (Mittler, 2002, Vega et al., 2006). Para evitar la



perturbación del metabolismo, la célula activa un conjunto de mecanismos protectores, entre ellos, la inducción de enzimas antioxidantes (Mittler, 2002, Pokora y Tukaj, 2010). En el caso de las células expuestas al OMP observamos un aumento significativo de los niveles de ROS intracelulares (capítulo II), por lo que en este caso, los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo de las microalgas no pudieron regular la sobreproducción de estas especies inducida por el fármaco. La generación de ROS por el OMP también podría estar implicada en la iniciación de daño a la membrana por la inducción de peroxidación lipídica, lisis o desesterificación de ácidos grasos (Cid et al., 1996). Cuando se ha superado cierto umbral de producción de ROS, los mecanismos de defensa antioxidantes celulares ya no pueden responder lo suficiente y el estrés oxidativo conduce a la disrupción de la membrana y finalmente a la muerte celular (Hess, 2000; Esperanza et al., 2015). En las algas, el exceso de ROS puede afectar muchas funciones celulares a través de la modificación de los ácidos nucleicos, oxidación de proteínas, deterioro de las clorofilas y la inducción de la peroxidación lipídica (Ledford y Niyogi, 2005, Mittler et al., 2004, Vavilala et al., 2016).

Aunque los ROS siempre fueron considerados subproductos metabólicos tóxicos que en última instancia conducen a la muerte celular, hoy en día se reconoce que los ROS actúan también como mensajeros secundarios implicados en redes de señalización (D'Autréaux y Toledano, 2007). Esta función indica que las células han desarrollado estrategias para utilizar los ROS como señales biológicas que controlan diversos programas genéticos de respuesta al estrés, como se ha visto en diatomeas (Rosenwasser et al., 2014). Además, existen evidencias de que el estrés oxidativo juega un papel en la senescencia en las plantas, puesto que se ha formulado la hipótesis de que un desequilibrio entre la generación de ROS, la protección antioxidante y la reparación del daño oxidativo puede conducir a la senescencia (Beckman y Ames, 1998; Sohal, 2002). Las células vegetales también parecen generar ROS a propósito como moléculas de señalización para controlar la muerte celular programada (Apel y Hirt, 2004).

### ALTERACIONES DEL pH INTRACELULAR

Por último, otro de los parámetros evaluados en este estudio ha sido el pH intracelular ( $\text{pH}_i$ ). El mantenimiento del pH fisiológico en el rango óptimo es de gran importancia para la correcta actividad de muchas enzimas y el funcionamiento eficaz de los canales iónicos y elementos contráctiles celulares. Además, las oscilaciones en el pH son también importantes en el control del ciclo celular y la capacidad proliferativa de las células (Madshus, 1988).

Debido a que las reacciones bioquímicas necesitan un pH óptimo, las células tienen sistemas reguladores para mantener la homeostasis y, a pesar de las fluctuaciones inducidas metabólicamente y ambientalmente, el  $\text{pH}_i$  se mantiene en torno a 7,5 (Roos et al., 2006). Este control del pH citosólico se mantiene gracias a la regulación de los procesos de transporte de iones entre los compartimentos intracelulares (citosol, vacuola y cloroplasto, fundamentalmente) y entre la célula y el medio externo.

Los protones desempeñan muchas funciones en la señalización, el desarrollo y la regulación metabólica por lo que los organismos eucariotas han desarrollado mecanismos para el control homeostático. Las alteraciones en los niveles intracelulares de protones e iones como el calcio, así como las variaciones en el potencial de membrana citoplasmático se consideran mecanismos de transducción de la señal en la célula, es decir, mensajeros secundarios que actúan frente a determinados estímulos ambientales y que conducen a diferentes respuestas a nivel de la fisiología celular. En este estudio, todas las concentraciones de OMP ensayadas alteraron el  $\text{pH}_i$  de las células de *T. suecica* de una manera dependiente de la concentración (capítulo II). Cuanto mayor es la concentración de OMP en el medio de cultivo, más acusada es la acidificación intracelular que se produce. Como se ha discutido anteriormente, debido al mecanismo de acción del OMP, este compuesto podría afectar a las bombas de protones de organismos no diana como las microalgas. Estas bombas transportan protones desde el citoplasma al exterior de la célula (en el caso de aquellas situadas en la membrana plasmática) y hacia compartimentos intracelulares como las vacuolas (en

el caso de aquellas situadas en el tonoplasto). Por lo que la inhibición de estas bombas por el contaminante podría conducir a la acumulación de protones en la célula y, por consiguiente, la acidificación del citosol. Se ha visto que inhibidores de la bomba de protones como el OMP provocan la alteración del gradiente de pH intra-extracelular y la acumulación de protones en el citosol de células tumorales. La inhibición de la bomba de protones desencadena una muerte celular rápida en este tipo de células como resultado de la acidificación intracelular, la activación de caspasas y la acumulación temprana de ROS (Luciani et al., 2004; Marino et al., 2010).

Los ambientes marinos se caracterizan por sus altos niveles de sodio y por un pH relativamente estable y ligeramente alcalino (8,2) (Taylor et al., 2012). Se ha demostrado que este alto gradiente de potencial electroquímico es utilizado por organismos marinos, como las cianobacterias y las microalgas, que usan bombas del tipo  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasas como principal mecanismo de transporte para generar gradientes electroquímicos a través de la membrana plasmática (Hellebust 1978; Rees et al., 1980; Raven 1984). El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  se expresa en la gran mayoría de células eucariotas y es el mecanismo regulador de la homeostasis del pH intracelular en el fitoplancton marino (Noël y Pouysségur, 1995). El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  utiliza el gradiente electroquímico de iones  $\text{Na}^+$ , generado por las  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasas, para extraer  $\text{H}^+$  del citosol celular. La presencia de OMP en ambientes marinos podría afectar la función de estas bombas de protones que regulan los gradientes de pH.

Se han detectado pequeñas variaciones en el  $\text{pH}_i$  con el fluorocromo BCECF AM únicamente en el caso de las células expuestas a OMP, ya que este contaminante indujo una marcada acidificación intracelular. Sin embargo, con el resto de contaminantes no se ha observado un cambio significativo del  $\text{pH}_i$ . Esto puede deberse, en parte, a que el espectro de emisión del fluorocromo utilizado, que ha sido lo analizado en este estudio, es mucho menos dependiente del pH que el espectro de excitación, por lo que puede que pequeñas variaciones en el  $\text{pH}_i$  no puedan ser detectadas. Por esta razón su uso no es recomendable como indicador sensible de los efectos a corto plazo de los contaminantes.

En este estudio se ha utilizado la CMF para el estudio de las potenciales alteraciones que distintos contaminantes emergentes provocan en la microalga marina *T. suecica*, ya que esta técnica nos permite llevar a cabo la medida de parámetros a nivel de la célula individual. Como se ha visto, es una gran ventaja frente a los ensayos tradicionales de inhibición del crecimiento, puesto que éstos reflejan un valor medio de la población, sin tener en cuenta la respuesta que se produce a nivel celular. De este modo, se han podido detectar alteraciones en la fisiología microalgal transcurridas sólo 24 h de exposición a concentraciones subletales de los contaminantes emergentes, antes de que se puedan detectar cambios significativos en el crecimiento o la viabilidad celular (Tabla 4).

**Tabla 4.** Respuesta citotóxica de *T. suecica* tras 24 h de exposición a los distintos contaminantes emergentes atendiendo a los biomarcadores de citotoxicidad más sensibles utilizados en este estudio. En el potencial de membrana medido con el fluorocromo DiBAC<sub>4</sub>(3), un incremento se corresponde con una despolarización de la membrana; mientras que un descenso se corresponde con una hiperpolarización. s/c = sin cambios significativos a las concentraciones ensayadas ( $p \geq 0,05$ ).

Parámetros analizados por CMF	Contaminantes emergentes						
	Fármacos				Productos de cuidado e higiene personal (PCPs)		
	CLO	FLO	OTC	OMP	BP-3	TCS	AHTN
Tamaño (FS)	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↑
Autofluorescencia (FL4)	↑	↑	↑	↓	↑	↓	s/c
Vitalidad (FDA)	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↓
Potencial membrana (DiBAC <sub>4</sub> (3))	s/c	s/c	s/c	↓	↑	↓	↑

Atendiendo a estos resultados, dentro del grupo de los fármacos, podemos observar que la respuesta citotóxica de *T. suecica* es igual para todos los antibióticos ensayados, pero totalmente opuesta a la respuesta obtenida con el OMP. Se podría concluir que estas diferencias se deben a la diferente diana de acción de estas dos clases de fármacos en la microalga. Los antibióticos afectan principalmente a cloroplastos y mitocondrias, mientras que el OMP afecta a las membranas celulares (Tabla 4). Dentro del grupo de los PCPs, podemos observar que los contaminantes ensayados se pueden clasificar en dos grupos basándose en la respuesta citotóxica observada, como se ha comentado en el capítulo III. Un grupo estaría formado sólo por el filtro UV BP-3, que produce en un primer momento una estimulación metabólica general o incremento en la vitalidad celular; mientras que el otro grupo estaría formado por TCS y AHTN, que provocaron un descenso en la vitalidad celular. Por último, también podemos observar que la respuesta al TCS es similar a la obtenida con el OMP, lo que puede asociarse a alguno de los mecanismos de acción conocidos de este conservante, como la desestabilización de las membranas y la pérdida de sus funciones de barrera semipermeable comentadas en el capítulo III (Tabla 4).

En resumen, dentro de los parámetros analizados por CMF, aquellos relacionados con las propiedades inherentes celulares, como el tamaño y la autofluorescencia celular, han resultado de gran utilidad al ser biomarcadores rápidos, eficaces y de bajo coste, puesto que no es necesario utilizar ningún fluorocromo para su medición. En particular, la medida de la fluorescencia microalgal nos da información sobre la actividad fotosintética, por lo que debe ser uno de los biomarcadores principales en ecotoxicología para la monitorización de la degradación de los ecosistemas marinos. La medida de la actividad esterasa con el ensayo de hidrólisis del FDA también ha sido uno de los parámetros más sensibles. Posee una relación directa con la actividad metabólica general de la célula y permite discriminar, tras períodos muy breves de exposición a los contaminantes, entre células sanas y estresadas, cuantificando respuestas mínimas frente a los impactos ambientales. Por último, hemos visto que la exposición a los contaminantes emergentes daña la membrana

plasmática de las células principalmente mediante cambios en sus propiedades de permeabilidad, por lo que el estudio de las variaciones en el potencial de membrana citoplasmático han resultado de gran utilidad para evaluar los efectos a corto plazo que se producen en las células expuestas a concentraciones subletales.

## **6. CONCLUSIONES**

---





En vista de los resultados obtenidos, con respecto a lo establecido en el **objetivo 1** sobre la determinación del efecto tóxico sobre el crecimiento de *T. suecica* provocado por distintos fármacos y productos de cuidado e higiene personal, se puede concluir:

**1.1.** El crecimiento de los cultivos de *T. suecica* se ve negativamente afectado por la presencia en el medio de los distintos contaminantes emergentes ensayados, de una forma dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. Sin embargo, la concentración más baja del antibiótico OTC ( $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), provoca un fenómeno de hormesis, estimulando de forma significativa el crecimiento con respecto al control.

**1.2.** La toxicidad de los distintos contaminantes emergentes ensayados sobre *T. suecica*, en base a su efecto sobre el crecimiento, varía en función del grupo de contaminante utilizado. Los PCPs son más tóxicos para esta microalga que los fármacos; y dentro del grupo de los fármacos, los antibióticos mostraron mayor toxicidad que el OMP.

Con respecto a lo establecido en el **objetivo 2**, sobre el estudio de las alteraciones citómicas provocadas por los diferentes contaminantes emergentes ensayados, se puede concluir:

**2.1.** Las células microalgales mostraron alteraciones morfológicas y fisiológicas transcurridas sólo 24 h de exposición a concentraciones subletales de los distintos contaminantes emergentes ensayados, antes de producirse un descenso significativo en la densidad o viabilidad celular de los cultivos; aunque la respuesta citotóxica varía en función del contaminante utilizado.

**2.2.** Las microalgas expuestas a los tres antibióticos ensayados mostraron alteraciones en los parámetros relacionados con la fotosíntesis, así como un descenso

de la actividad celular, toxicidad que se relaciona con el origen bacteriano de cloroplastos y mitocondrias.

**2.3.** El OMP puede afectar a receptores de organismos unicelulares no diana como las microalgas que regulan el flujo de protones en el citoplasma, alterando la homeostasis celular y provocando una sobreproducción de ROS que da lugar, en último término, a la muerte celular.

**2.4.** Los tres PCPs ensayados se pueden clasificar en dos grupos basándose en la respuesta citotóxica observada. Un grupo formado sólo por el filtro UV BP-3, que produce en un primer momento una estimulación metabólica general; y otro grupo formado por el conservante TCS y la fragancia AHTN, que provocan un descenso en la vitalidad celular. Las diferencias detectadas en la citotoxicidad pueden asociarse a las distintas dianas de acción de estos contaminantes en la microalga.

Con respecto a lo establecido en el **objetivo 3**, sobre la evaluación de la sensibilidad y aplicabilidad de los protocolos de CMF utilizados, en la determinación de la potencial citotoxicidad de los contaminantes emergentes, se puede concluir:

**3.1.** La medida de la fluorescencia de la clorofila  $a$  por CMF es un parámetro sensible que, al ser una propiedad inherente de las células microalgales, puede ser utilizado como biomarcador eficaz, rápido y de bajo coste, alternativo al crecimiento. Al proporcionar información de la actividad fotosintética microalgal, es útil para monitorizar la degradación medioambiental de los ecosistemas marinos y debe ser uno de los biomarcadores principales en ecotoxicología.

**3.2.** La medida de la actividad esterasa con el ensayo de hidrólisis del FDA es un parámetro muy sensible ya que tiene una relación directa con la actividad metabólica general o vitalidad celular y permite discriminar, tras períodos muy breves de

exposición a los contaminantes, entre células sanas y estresadas, cuantificando respuestas sutiles frente a los impactos ambientales.

**3.3.** La exposición a los contaminantes emergentes daña la membrana plasmática de las células de *T. suecica* mediante cambios en sus propiedades de permeabilidad, por lo que el estudio de las variaciones en el potencial de membrana citoplasmático es de gran utilidad para evaluar los efectos a corto plazo que se producen en las células expuestas a concentraciones subletales de estos compuestos.

La microalga utilizada en este estudio, *Tetraselmis suecica*, es una especie fácil de cultivar y de crecimiento rápido que, debido a su corto ciclo de vida, proporciona una rápida respuesta frente a los impactos ambientales. Los parámetros analizados por CMF han permitido caracterizar dicha respuesta en esta microalga, que ha mostrado sensibilidad frente a los distintos tipos de contaminantes emergentes ensayados a diferentes niveles de la fisiología celular, avalando su aplicación como biomarcadores en biosensayos de toxicidad. En base a todo lo anteriormente expuesto, podemos concluir finalmente que se justifica la utilización de esta especie de microalga, utilizando estos marcadores de contaminación mediante la técnica de citometría de flujo, en estudios de ecotoxicología. Estos ensayos podrían ser de utilidad en los programas rutinarios de monitorización y determinación del potencial efecto tóxico de contaminantes acuáticos emergentes, contribuyendo a la elaboración de nuevas directrices para un uso más racional y menos agresivo para el entorno de este tipo de compuestos.



## **7. CONCLUSIONS**

---



Taking into account the results obtained, regarding the established in the **objective 1** about the determination of the toxic effect on the growth of *T. suecica* caused by different pharmaceuticals and personal care products, it can be concluded:

**1.1.** The growth of *T. suecica* cultures was negatively affected by the presence in the environment of the different emerging pollutants tested, in a concentration and time dependent manner. However, the lowest concentration of the antibiotic OTC (2.5 mg L<sup>-1</sup>), causes a phenomenon of hormesis, stimulating significantly the growth with respect to the control.

**1.2.** The toxicity of the different emerging pollutants on *T. suecica*, based on their effect on growth, depends on the group of the pollutant tested. PCPs are more toxic to this microalga than pharmaceuticals; and within the pharmaceuticals, antibiotics showed higher toxicity than OMP.

Regarding the established in the **objective 2** about the study of the cytotoxic alterations caused by the different emerging pollutants tested, it can be concluded:

**2.1.** Microalgal cells showed morphological and physiological alterations after only 24 h of exposure to sublethal concentrations of the different emerging pollutants assayed, before a significant decrease in cell density or viability of the cultures was detected; although the cytotoxic response differs depending on the pollutant tested.

**2.2.** Microalgae exposed to the three antibiotics assayed showed alterations in the parameters related to photosynthesis, as well as a decrease in cellular activity; toxicity that could be related to the bacterial origin of chloroplasts and mitochondria.

**2.3.** OMP may trigger receptors in non-target unicellular organisms such as microalgae that regulate the proton flux in the cytoplasm, disturbing pH homeostasis and provoking an overproduction of ROS that ultimately leads to cell death.

**2.4.** The three PCPs assayed could be classified into two groups, based on the cytotoxic response observed. One group formed only by the UV filter BP-3, which initially produces a general metabolic activity stimulation; and another group formed by the disinfectant TCS and the fragrance AHTN, which provoke a decrease in cellular vitality. Differences detected in the cytotoxicity could be associated to the different targets of action of these pollutants on microalgae.

Regarding the established in the **objective 3** about the evaluation of the sensitivity and applicability of the FCM protocols used, in the determination of the potential cytotoxicity of emerging pollutants, it can be concluded:

**3.1.** Chlorophyll *a* fluorescence measurement by FCM is a sensitive parameter that, as it is an inherent microalgal cell property, it can be used as an effective, fast and low cost biomarker, alternative to growth. It provides information on microalgal photosynthetic activity, so it is useful to monitor environmental degradation of marine ecosystems and should be one of the main biomarkers in ecotoxicology.

**3.2.** Esterase activity measurement by the FDA assay is a very sensitive parameter since it relates directly to the general metabolic activity of the cell and it allows discriminating, after short periods of pollutant exposure, between healthy and stressed cells, quantifying subtle responses to environmental impacts.

**3.3.** Exposure to the emerging pollutants damages the cytoplasmic membrane of *T. suecica* cells through changes in their permeability properties, thus the study of the variations in cytoplasmic membrane potential is very useful to evaluate the short-term effects in cells exposed to sublethal concentrations of these compounds.

The microalga used in this study, *Tetraselmis suecica*, is easy to culture, fast-growing and, due to its short life cycle, it provides a fast response to environmental impacts. The parameters analysed by FCM allowed the characterization of this



response on this microalga, which has shown sensitivity to the different types of emerging contaminants tested at different levels of the cell physiology, endorsing their application as biomarkers in toxicity bioassays. Based on all the above-mentioned, we can finally conclude that the use of this microalgal species, using these markers of contamination with the flow cytometry technique, is justified in ecotoxicology studies. These assays could be useful in the determination of the potential toxic effect of emerging aquatic contaminants in routine monitoring programs, contributing to the development of new guidelines for a more rational and less aggressive use for the environment of this type of compounds.



## **8. BIBLIOGRAFÍA**

---



- Abel, P. D., Axiak, V., 1991. Ecotoxicology and the marine environment. Ellis Horwood, England. 269 pp.
- Abiusi, F., Sampietro, G., Marturano, G., Biondi, N., Rodolfi, L., D'Ottavio, M., Tredici, M. R., 2014. Growth, photosynthetic efficiency, and biochemical composition of *Tetraselmis suecica* F&M-M33 grown with LEDs of different colors. Biotechnol. Bioeng. 111, 956–964.
- Adler, N. E., Schmitt-Jansen, M. Altenburger, R., 2007. Flow cytometry as a tool to study phytotoxic modes of action. Environ. Toxicol. Chem. 26, 297-306.
- Afonso-Olivares, C., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J. J., 2017. Occurrence and environmental impact of pharmaceutical residues from conventional and natural wastewater treatment plants in Gran Canaria (Spain). Sci. Total Environ. 599-600, 934–943.
- Aminov, R. I., 2010. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. Front. Microbiol. 1, 1-7.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu. Rev. Plant, Biol. 55, 373-399.
- Balmer, M. E., Buser, H. R., Müller, M. D., Poiger, T., 2005. Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss Lakes. Environ. Sci. Technol. 39, 953–62.
- Barange, M., Field, J. G., Harris, R. P., Eileen, E., Hofmann, E. E., Perry, R. I., Werner, F., 2010. Marine Ecosystems and Global Change. Oxford University Press. 436 pp.
- Barceló, D., 2003. Emerging pollutants in water analysis. TrAC – Trends Analyt. Chem. 22, 14-16.
- Bartoli, C. G., Gómez, F., Martínez, D. E., Guiamet, J. J., 2004. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). J. Exp. Bot. 55, 1663-1669.

- Battah, M., Shabana, E. F., Kobbia, I. A., Eladel, H. M., 2001. Differential effects of thiobencarb toxicity on growth and photosynthesis of *Anabaena variabilis* with changes in phosphate level. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 235-239.
- Beckman, K. B., Ames, B. N., 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78, 547-581.
- Behera, S. K., Kim, H. W., Oh, S. Y., Park, H. S., 2012. Sorptive removal of ibuprofen from water using selected soil minerals and activated carbon. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 9, 85–94.
- Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., McClain, C. R., Feldman, G. C., Los, S.O., Tucker, C. J., Falkowski, P. G., Field, C. B., Frouin, R., Esaias, W. E., Kolber, D. D., Pollack, N.H., 2001. Biospheric primary production during an ENSO transition. *Science* 291, 2594 – 2597.
- Benedé, J. L., Chisvert, A., Salvador, A., Sánchez-Quiles, D., Tovar-Sánchez, A., 2014. Determination of UV filters in both soluble and particulate fractions of seawaters by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 812, 50–58.
- Benov, L., Szejnberg, L., Fridovich, I., 1998. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 826-831.
- Bi Fai, P., Grant, A. Reid, B., 2007. Chlorophyll *a* fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1520-1531.
- Blaise, C., Ménard, L., 1998. A micro-algal solid phase test to assess the toxic potential of freshwater sediments. *Water Qual. Res. J. Can.* 33, 133-151.
- Blanco, M. M., Liébana, P., Gibello, A., Alcalá, C., Fernández-Garayzábal, J. F., Domínguez, L., 2004. Principales patologías bacterianas en la piscicultura española. REDVET – Revista Electrónica de Veterinaria. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020204.html>.

- Bold, H. C., Wynne, M. J., 1985. Introduction to the Algae. 2<sup>a</sup> ed. Prentice-Hall Inc., New Jersey. 720 pp.
- Boon, P. I., Cattanach, M., 1999. Antibiotic resistance of native and faecal bacteria isolated from rivers, reservoirs and sewage. Lett. Appl. Microbiol. 28, 164-168.
- Bortner, C. D., Gómez-Angelats, M., Cidlowski, J. A., 2001. Plasma membrane depolarization without repolarization is an early molecular event in anti-Fas-induced Apoptosis. J. Biol. Chem. 276, 4303-4314.
- Brausch, J. M., Rand, G. M., 2011. A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. Chemosphere 82, 1518–1532.
- Breeuwer, P., Abee, T., 2000. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. Int. J. Food Microbiol. 55, 193-200.
- Brookes, J. D., Geary, S. D., Ganf, G. G., Burch, M. D., 2000. Use of FDA and flow cytometry to assess metabolic activity as an indicator of nutrient status in phytoplankton. Mar. Freshwater Res. 51, 817-823.
- Buchberger, W. W., 2007. Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. Anal. Chim. Acta. 593, 129–139.
- Burka, J., Hammell, K., Horsberg, T., Johnson, G., Rainnie, D., Speare, D., 1997. Drugs in salmonid aquaculture - a review. J. Vet. Pharmacol. Ther. 20, 333-349.
- Burrows, E. M., 1971. Assessment of pollution effects by the use of algae. Proceedings of the Royal Society of London B: Biol. Sci. 177, 295-306.
- Butcher, R. W., 1959. An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. I. Introduction and *Chlorophyceae*. Fish. Invest., London series IV, 1-74.
- Cabello, F. C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environ. Microbiol. 8, 1137 – 1144.

- Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, M. P., Saoncella, A., 2001. An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Wat. Res.* 35, 69-76.
- Carpenter, K. E., 1924. A study of the fauna of rivers polluted by lead mining in the Aberystwyth district of Cardiganshire. *Ann. Appl. Biol.* 11, 1-23.
- Carter, N. P., 1990. Measurement of cellular subsets using antibodies. En: *Flow Cytometry. A Practical Approach*. Ormerod, M. G. (Ed.). Oxford University Press, Oxford. pp. 45-67.
- Carter, N. P., Meyer, E. W., 1990. Introduction to the principles of flow cytometry. En: *Flow Cytometry. A Practical Approach*. Ormerod, M. G. (Ed.). Oxford University Press, Oxford. pp. 1-28.
- Chagas, R. M., Silveira, J. A. G., Ribeiro, R. V., Vitorello, V. A., Carrer, H., 2008. Photochemical damage and comparative performance of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in sugarcane leaves exposed to paraquat-induced oxidative stress. *Pest. Biochem. Physiol.* 90, 181-188.
- Chalifour, A., Spear, P. A., Boily, M. H., DeBlois, C., Giroux, I., Dassylva, N., Juneau, P., 2009. Assessment of toxic effects of pesticide extracts on different green algal species by using chlorophyll *a* fluorescence *Toxicol. Environ. Chem.* 91, 1315-1329.
- Chankova, S. G., Dimova, E. G., Mitrovska, Z., Miteva, D., Mokerova, D. V., Yonova, P. A., Yurina, N. P., 2014. Antioxidant and HSP70B responses in *Chlamydomonas reinhardtii* genotypes with different resistance to oxidative stress. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 101, 131-137.
- Chisholm, S. W., Olson, R. J., Zettler, E. R., Goericke, R., Waterbury, J. B., Welschmeyer, N. A., 1988. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature* 334, 340-343.
- Chisti, F., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294– 306.



- Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline antibiotics: mode of actions, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 232-260.
- Chou, T. C., Martin, N., 2005. *CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantification of Synergism and Antagonism in Drug Combinations and the Determination of IC<sub>50</sub> and ED<sub>50</sub> and LD<sub>50</sub> Values.* ComboSyn, Inc., Paramus, N.J.
- Chrétiennot-Dinet M. J., 1990. *Atlas du phytoplancton marin.* Vol. 3. Editions du CNRS, Paris. 261 pp.
- Cid, Á., Fidalgo, P., Herrero, C., Abalde, J., 1996. Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry. *Cytometry* 25, 32–36.
- Cid, Á., Herrero, C., Torres, E., Abalde, J., 1995. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquat. Toxicol.* 31, 165-174.
- Cid, Á., Torres, E., Herrero, C., Abalde, J., 1997. Disorders provoked by copper in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* in short-time exposure assays. *Cah. Biol. Mar.* 38, 201-206.
- Cirulis, J. T., Scott, J. A., Ross, G. M., 2013. Management of oxidative stress by microalgae. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 91, 15-21.
- Clara, M., Gans, O., Windhofer, G., Krenn, U., Hartl, W., Braun, K., Scharf, S., Scheffknecht, C., 2011. Occurrence of polycyclic musks in wastewater and receiving water bodies and fate during wastewater treatment. *Chemosphere* 82, 1116–1123.
- Corrêa, A. X. R., Tamanaha, M. S., Horita, C. O., Radetski, M. R., Corrêa, R., Radetski, C. M., 2009. Natural impacted freshwaters: in situ use of alginate immobilized algae to the assessment of algal response. *Ecotoxicology* 18,

464–469.

- Corvini, P. F. X., Gautier, H., Rondangs, E., Vivier, H., Goergen, J. L., Germain, P., 2000. Intracellular pH determination of pristinamycin-producing *Streptomyces pristinaesperalis* by image analysis. *Microbiology* 146, 2671-2678.
- Cossarizza, A., Salvioli, S., 2001. Analysis of mitochondria during cell death. En: *Cytometry. Part A*. Darzynkiewicz, Z., Crissman, H. A., Robinson, J. P. (Eds). Academic Press, London. pp. 467-486.
- Couderchet, M., Vernet, G., 2003. Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 271-277.
- Cunningham, A., 1993. Analysis of microalgae and cyanobacteria by flow cytometry. En: *Flow Cytometry in Microbiology*. Lloyd, D. (Ed.). Springer-Verlag, London, UK. pp. 131-142.
- D'Autréaux, B., Toledano, M. B., 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 813–824.
- Dann, A. B., Hontela, A., 2011. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *J. Appl. Toxicol.* 31, 285-311.
- Darzynkiewicz, Z., 1994. Assays of cell viability: Discrimination of cells dying by apoptosis. *Meth. Cell Biol.* 41, 16-39.
- Daughton, C. G., Ternes, T. A., 1999. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the environment : agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* 107, 906-938.
- Debelius, B., Forja, J. M., Del Valls, T. A., Lubián, L. M., 2008. Effect of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and atrazine on marine microalgae. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 559-568.
- Debelius, B., Forja, J. M., Del Valls, A., Lubián, L. M., 2009. Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. *Ecotoxicol.*

- Environ. Saf. 72, 1503–1513.
- DellaGreca, M., Fiorentino, A., Iesce, M. R., Isidori, M., Nardelli, A., Previtiera, L., 2003. Identification of phototransformation products of prednisone by sunlight toxicity of the drug and its derivatives on aquatic organisms. Environ. Toxicol. Chem. 22, 534–539.
- DellaGreca, M., Iesce, M. R., Previtiera, L., Rubino, M., Temussi, F., Brigante, M., 2006. Degradation of lansoprazole and omeprazole in the aquatic environment. Chemosphere 63, 1087–1093.
- Dewez, D., Geoffroy, L., Vernet, G., Popovic, R., 2005. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. Aquat. Toxicol. 74, 150-159.
- di Toppi, L. S., Musetti, R., Vattuone, Z., Pawlik-Skowronska, B., Fossati, F., Bertoli, L., Badiani, M., Favali, M. A., 2005. Cadmium distribution and effects on ultrastructure and chlorophyll status in photobionts and mycobionts of *Xanthoria parietina*. Microsc. Res. Techn. 66: 229-238.
- Díaz-Cruz, M. S., Gago-Ferrero, P., Llorca, M., Barceló, D., 2012. Analysis of UV filters in tap water and other clean waters in Spain. Anal. Bioanal. Chem. 402, 2325–2333.
- Díaz-Cruz, M. S., López de Ayala, M. J., Barceló, D., 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. Trends Anal. Chem. 22, 340-351.
- Diniz, M. S., Salgado, R., Pereira, V. J., Carvalho, G., Oehmen, A., Reis, M. A. M., Noronha, J. P., 2015. Ecotoxicity of ketoprofen, diclofenac, atenolol and their photolysis by-products in zebrafish (*Danio rerio*). Sci. Total Environ. 505, 282–289.
- Dinsdale, M. G., Lloyd, D., Jarvis, B., 1995. Yeast vitality during cider fermentation:

two approaches to the measurement of membrane potential. *J. Inst. Brew.* 101, 453–458.

Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.

Directiva 2008/42/CE de la Comisión, de 3 de abril de 2008, por la que se modifica la Directiva 76/768/CEE del Consejo, relativa a los productos cosméticos, a fin de adaptar sus anexos II y III al progreso técnico.

Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas.

Directiva 91/271/CEE, del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas.

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.

Droop, M. R., 1969. Algae. En: *Methods in Microbiology*. Vol. 38. Academic Press, New York. pp. 269-313.

Durrieu, C., Tran-Minh, C., Chovelon, J. M., Barthet, L., Chouteau, C., Védrine, C., 2006. Algal biosensors for aquatic ecosystems monitoring. *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* 36, 205-209.

Ekelund, N. G. A., Aronson, K. A., 2007. Changes in chlorophyll *a* fluorescence in *Euglena gracilis* and *Chlamydomonas reinhardtii* after exposure to wood-ash. *Environ. Exp. Bot.* 59, 92-98.

Ekmekci, Y., Terzioglu, S., 2005. Effects of oxidative stress induced by paraquat on wild and cultivated wheats. *Pest. Biochem. Physiol.* 83, 69-81.

El-Sheekh, M., Abomohra Ael, F., Hanelt, D., 2013. Optimization of biomass and

- fatty acid productivity of *Scenedesmus obliquus* as a promising microalga for biodiesel production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 915-922.
- Endo, R., Omasa, K., 2004. Chlorophyll fluorescence imaging of individual algal cells: effects of herbicide on *Spirogyra distenta* at different growth stages. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4165-4168.
- 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. *Aquat. Toxicol.* 165, 64–72.
- Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2016. Early alterations on photosynthesis-related parameters in *Chlamydomonas reinhardtii* cells exposed to atrazine: A multiple approach study. *Sci. Total Environ.* 554-555, 237–245.
- Eullaffroy, P., Frankart, C., Aziz, A., Couderchet, M., Blaise, C., 2009. Energy fluxes and driving forces for photosynthesis in *Lemna minor* exposed to herbicides. *Aquat. Bot.* 90, 172-178.
- Eullaffroy, P., Vernet, G., 2003. The F684/F735 chlorophyll fluorescence ratio: a potential tool for rapid detection and determination of herbicide phytotoxicity in algae. *Wat. Res.* 37, 1983-1990.
- Fábregas J., Otero, A., Domínguez, A., Patiño, M., 2001. Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. *J. Mar. Biotechnol.* 3, 256–263.
- Fábregas, J., 1982. Las microalgas como eslabón de infraestructura en la Microbiología Marina: aislamiento, caracterización, ciclo celular y aprovechamiento tecnológico. Tesis Doctoral. Universidade de Santiago de Compostela. 467 pp.
- Fent, K., Kunz, P. Y., Zenker, A., Rapp, M., 2010. A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethyl-hexyl-

- 4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor. *Mar. Environ. Res.* 69, S4–S6.
- Fentem, J., Balls, M. 1993. Replacement of fish in ecotoxicology testing: use of bacteria, other lower organism and fish cells *in vitro*. En: *Ecotoxicology Monitoring*. Richardson, M. (Ed.). VCH, Weinheim. pp. 71-81.
- Fernández-Naveira, A., Rioboo, C., Cid, Á., Herrero, C., 2016. Atrazine induced changes in elemental and biochemical composition and nitrate reductase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Phycol.* 262, 1-8.
- Forbes, V. E., Forbes, T. L., 1994. *Ecotoxicology in theory and practice*. Chapman & Hall Ecotoxicology Series 2. Springer, Netherlands. 248 pp.
- Foyer, C. H., Noctor, G., 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17, 1866-1875.
- Franck, P., Petitpain, N., Cherlet, M., Dardennes, M., Maachi, F., Schutz, B., Poisson, L., Nabet, P., 1996. Measurement of intracellular pH in cultured cells by flow cytometry with BCECF-AM. *J Biotechnol.* 46, 187-195.
- Franklin, N. M., Stauber, J. L., Lim, P., 2001. Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 160-170.
- Gago-Ferrero, P., Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D., 2011. Occurrence of multiclass UV filters in treated sewage sludge from wastewater treatment plants. *Chemosphere* 84, 1158–1165.
- Galbraith, D. W., Harpins, K. R., Jefferson, R. A., 1988. Flow cytometric characterization of the chlorophyll contents and size distributions of plant protoplasts. *Cytometry* 9, 75-83.
- García-Jares, C., Llompарт, M., Polo, M., Salgado, C., Macias, S., Cela, R., 2002. Optimisation of a solid-phase microextraction method for synthetic musk

- compounds in water. *J. Chromatogr. A* 963, 277–285.
- García-Jares, C., Regueiro, J., Barro, R., Dagnac, T., Llompart, M., 2009. Analysis of industrial contaminants in indoor air. Part 2. Emergent contaminants and pesticides. *J. Chromatogr. A* 1216, 567–597.
- Geary, S., Ganf, G., Brookes, J., 1997. The use of FDA and flow cytometry to measure the metabolic activity of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. *Verh. Int. Verein Limnol.* 26, 2367-2369.
- Geoffroy, L., Dewez, D., Vernet, G., Popovic, R., 2003. Oxyfluorfen toxic effect on *S. obliquus* evaluated by different photosynthetic and enzymatic biomarkers. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 445- 452.
- 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*. *Aquat Toxicol.* 83, 149-158.
- Gerencser, A. A., Chinopoulos, C., Birket, M. J., Jastroch, M., Vitelli, C., Nicholls, D. G., Brand, M. D., 2012. Quantitative measurement of mitochondrial membrane potential in cultured cells: calcium-induced de- and hyperpolarization of neuronal mitochondria. *J. Physiol.* 590, 2845–2871.
- Gergely, P., Grossman, C., Niland, B., Puskas, F., Neupane, H., Allam, F., Banki, K., Phillips, P. E., Perl, A., 2002. Mitochondrial hyperpolarization and ATP depletion in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 46, 175–190.
- Gilbert, F., Galgani, F., Cadiou, Y., 1992. Rapid assessment of metabolic activity in marine microalgae: application in ecotoxicological tests and evaluation of water quality. *Mar. Biol.* 112, 199-205.
- Gilbert, P., McBain, A. J., 2002. Literature-based evaluation of the potential risks associated with impregnation of medical devices and implants with triclosan. *Surg. Infect. (Larchmt)* 3 (Suppl. 1), S55–S63.

- Gimeno, R. A., Marce, R. M., Borrull, F., 2004. Determination of organic contaminants in coastal water. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 23, 341–350.
- Giokas, D. L., Salvador, A., Chisvert, A., 2007. UV filters: from sunscreens to human body and the environment. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 26, 360-374.
- Giovannini, C., Matarrese, P., Scazzocchio, B., Sanchez, M., Masella, R., Malorni, W., 2002. Mitochondria hyperpolarization is an early event in oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in Caco-2 intestinal cells. *FEBS Lett.* 523, 200–206.
- Giraldo, A., Montes, R., Rodil, R., Quintana, J. B., Vidal-Liñán, L., Beiras, R., 2017. Ecotoxicological evaluation of the UV filters ethylhexyl dimethyl p-aminobenzoic acid and octocrylene using marine organisms *Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis* and *Paracentrotus lividus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 606-611.
- Girling, A. E., Pascoe, D., Janssen, C. R., Peither, A., Wenzel, A., Schäfer, H., Neumeier, B., Mitchell, G. C., Taylor, E. J., Maund, S. J., Lay, J. P., Jüttner, I., Crossland, N. O., Stephenson, R. R., Persoone, G., 2000. Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 148-176.
- González-Barreiro, O., Rioboo, C., Cid, Á., Herrero, C., 2004. Atrazine-induced chlorosis in *Synechococcus elongatus* cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 301-307.
- González-López, C. V., Ación, F. G., Fernández-Sevilla, J. M., Molina, E., 2011. Uso de microalgas como alternativa a las tecnologías disponibles de mitigación de emisiones antropogénicas de CO<sub>2</sub>. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal* 2, 93-106.
- González-Naranjo, V., Boltes, K., 2014. Toxicity of ibuprofen and perfluorooctanoic acid for risk assessment of mixtures in aquatic and terrestrial environments. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 11, 1743–1750.



- González-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 Res.* 47, 2050-2064.
- González-Pleiter, M., Rioboo, C., Reguera, M., Abreu, I., Leganés, F., Cid, Á., Fernández-Piñas, F., 2017. Calcium mediates the cellular response of *Chlamydomonas reinhardtii* to the emerging aquatic pollutant Triclosan. *Aquat. Toxicol.* 186, 50–66.
- Gray, M. W., 1992. The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.* 141, 233-357.
- Graziano, L. M., Geider, R. J., Li, W. K. W., Olaizola, M., 1996. Nitrogen limitation of North Atlantic phytoplankton: analysis of physiological condition in nutrient enrichment experiments. *Aquat. Microb. Ecol.* 11, 53-64.
- Green, K., Brand, M. D., Murphy, M. P., 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 53, S110–S118.
- Gregorio, V., Chèvre, N., 2014. Assessing the risks posed by mixtures of chemicals in freshwater environments: case study of Lake Geneva, Switzerland. *Wiley Interdisciplinary Rev.: Water* 1, 229–247.
- Gumprecht, R., Gerlach, H., Nehrkorn, A., 1995. FDA hydrolysis and resazurin reduction as a measure of microbial activity in sediments from the south-east Atlantic. *Helgol. Mar. Res.* 49, 189-199.
- Hadjoudja, S., Vignoles, C., Delucht, V., Lenain, J. F., Le Jeune, A. H., Baudu, M., 2009. Short term copper toxicity on *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris* using flow cytometry. *Aquat. Toxicol.* 94, 255-264.
- Haglund, K., 1997. The use of algae in aquatic toxicity assessment. En: Round, F. E., Chapman D. J. (Eds.). *Progress in Phycological Research*. Biopress Lts., Bristol, England. pp. 181-212.

- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141, 312–322.
- Hapke, H. J. 1981. Possibilities and limitations of ecotoxicological testing of chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Chem.* 3, 227-237.
- Harman, A. W., Maxwell, M. J., 1995. An evaluation of the role of calcium in cell injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 129–144.
- Hauser, B. A., Sun, K., Oppenheimer, D. G., Sage, T. L., 2006. Changes in mitochondrial membrane potential and accumulation of reactive oxygen species precede ultrastructural changes during ovule abortion. *Planta* 223, 492-499.
- Heath, R. J., Rubin, J. R., Holland, D. R., Zhang, E., Snow, M. E., Rock, C. O., 1999. Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 274, 11110–11114.
- Heath, R. J., White, S. W., Rock, C. O., 2002. Inhibitors of fatty acid synthesis as antimicrobial chemotherapeutics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 695–703.
- Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131, 5–17.
- Hektoen, H., Berge, J. A., Hormazabal, V., Yndestad, M., 1995. Persistence of antibacterial agents in marine-sediments. *Aquaculture* 133, 175-184.
- Hellebust, J. A., 1978. Uptake of organic substrates by *Cyclotella cryptica* (*Bacillariophyceae*): effects of ions, ionophores and metabolic and inhibitors. *J. Phycol.* 14, 79–83.
- Henderson, L. M., Chappell, J. B., 1993. Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur. J. Biochem.* 217, 973-980.
- Hernando, M. D., Mezcuá, M., Fernández-Alba, A. R., Barceló, D., 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater

- effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69, 334-342.
- Herrera, G., Diaz, L., Martínez-Romero, A., Gomes, A., Villamón, E., Callaghan, R. C., O'Connor, J. E., 2007. Cytomics: A multiparametric, dynamic approach to cell research. *Toxicol. Vitr.* 21, 176–182.
- Herrero, C., Cid, Á., Fábregas, J., Abalde, J., 1991. Yields in biomass and chemical constituent of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquacult. Eng.* 10, 99-110.
- Hess, F. D., 2000. Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Sci.* 48, 160–170.
- Holzapel-Pschorn, A., Obst, U. Haberer, K., 1987. Sensitive methods for the determination of microbial activities in water samples using fluorogenic substrates. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 327, 521-523.
- Horn, J., 2000. The proton-pump inhibitors: similarities and differences. *Clin. Ther.* 22, 266–280.
- Huc, L., Lemarié, A., Guéraud, F., Héliès-Toussaint, C., 2012. Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro* 26, 709-717.
- Hutter, H. P., Wallner, P., Hartl, W., Uhl, M., Lorbeer, G., Gminski, R., Mersch-Sundermann, V., Kundi, M., 2010. Higher blood concentrations of synthetic musks in women above fifty years than in younger women. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 213, 124–130.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Parrella, A., 2005. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Sci. Total Environ.* 346, 87-98.
- ISO 10253:2016. Water quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema* sp. and *Phaeodactylum tricornutum*. International Organization for Standardization, Suiza.

- ISO 8692:2012. Water Quality - Fresh Water Algal Growth Inhibition Test With Unicellular Green Algae. International Organization for Standardization, Suiza.
- Jain, K. S., Shah, A. K., Bariwal, J., Shelke, S. M., Kale, A. P., Jagtap, J. R., Bhosale, A. V., 2007. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 1181–1205.
- Jamers, A., Blust, R., De Coen, W., 2009. Omics in algae: paving the way for a systems biological understanding of algal stress phenomena? *Aquat. Toxicol.* 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. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 167, 191-194.
- Jepras, R. I., Carter, J., Pearson, S. C., Paul, F. E., Wilkinson, M. J., 1995. Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2696-2701.
- Jochem, F. J., 1999. Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with fluorescein diacetate. *Mar. Biol.* 135, 721-728.
- Jochem, F. J., 2000. Probing the physiological state of phytoplankton at the single level. *Sci. Mar.* 64, 183-195.
- Jones, O., Voulvoulis, N., Lester, J., 2001. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a review. *Environ. Technol.* 22, 1383–1394.
- Kawanai, T., 2011. Triclosan, an environmental pollutant from health care products, evokes charybdotoxin-sensitive hyperpolarization in rat thymocytes. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 32, 417–422.
- Klapperstück, T., Glanz, D., Klapperstück, M., Wohlrab, J., 2009. Methodological aspects of measuring absolute values of membrane potential in human cells by flow cytometry. *Cytometry 75A*, 593-608.

- Kobbia, I. A., Battah, M. G., Shabana, E. F., Eladel, H. M., 2001. Chlorophyll  $\alpha$  fluorescence and photosynthetic activity as tools for the evaluation of simazine toxicity to *Protosiphon botryoides* and *Anabaena variabilis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 101-105.
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211.
- Konrad, K. R., Hedrich, R., 2008. The use of voltage-sensitive dyes to monitor signal-induced changes in membrane potential-ABA triggered membrane depolarization in guard cells. *Plant J.* 55, 161-173.
- Kosma, C. I., Lambropoulou, D. A., Albanis, T. A., 2016. Analysis, occurrence, fate and risks of proton pump inhibitors, their metabolites and transformation products in aquatic environment: a review. *Sci. Total Environ.* 569–570, 732–750.
- Kosma, C. I., Lambropoulou, D. A., Albanis, T. A., 2017. Photochemical transformation and wastewater fate and occurrence of omeprazole: HRMS for elucidation of transformation products and target and suspect screening analysis in wastewaters. *Sci. Total Environ.* 590-591, 592–601.
- Krol, E., Dziubinska, H., Trebaez, K., 2003. Low-temperature induced transmembrane potential changes in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Plant Cell Physiol.* 44, 527-533.
- Kümmerer, K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment – a review - Part I. *Chemosphere* 75, 417-434.
- 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.
- Lai, H. T., Hou, J. H., Su, C. I., Chen, C. L., 2009. Effects of chloramphenicol, florfenicol,

- and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis chuii*. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 329-334.
- Laws, E. A., Chalup, M. S., 1991. A microalgal growth model. *Limnol. Oceanogr.* 35, 597-608.
- Leal, A. M. D. S., de Queiroz, J. D. F., de Medeiros, S. R. B., Lima, T. K. D. S., Agnez-Lima, L. F., 2015. Violacein induces cell death by triggering mitochondrial membrane hyperpolarization in vitro. *BMC Microbiol.* 15, 115.
- Leboulanger, C., Rimet, F., de Lacotte, M. H. Bérard, A., 2001. Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae. *Environ. Int.* 26, 131-135.
- Ledford, H. K., Niyogi, K. K., 2005. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant Cell Environ.* 28, 1037-1045.
- 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. *J. Food Sci. Nutr.* 14, 21-28.
- Li, S., Crooks, P. A., Wei, X., de León, J., 2004. Toxicity of dipyrdyl compounds and related compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 34, 447-460.
- Lin, J., Wang, Y., Wang, G., 2006. Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. *J. Plant Physiol.* 163, 731-739.
- Liu, W., Ming, Y., Huang, Z., Li, P., 2012. Impacts of florfenicol on marine diatom *Skeletonema costatum* through photosynthesis inhibition and oxidative damages. *Plant Physiol. Biochem.* 60, 165–170.
- Liu, Z., Zhang, X., Bai, J., Suo, B., Xu, P., Wang, L., 2009. Exogenous paraquat changes antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in drought-stressed cucumber leaves. *Sci. Hortic.* 121, 138-143.
- Lloyd, D., Harris, J. C., Biagini, G. A., Hughes, M. R., Maroulis, S., Bernard, C., Wadley,

- R. B., Edwards, M. R., 2004. The plasma membrane of microaerophilic protists: oxidative and nitrosative stress. *Microbiology* 150, 1183–1190.
- Lloyd, D., Harris, J. C., Maroulis, S., Biagini, G. A., Wadley, R. B., Turner, M. P., Edwards, M. R., 2000. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: oxygen and its reaction products collapse membrane potential and cause cytotoxicity. *Microbiology* 146, 3109-3118.
- Loseva, N., Gordon, L., Alyabyev, A., Andreyeva, I., Kolesnikov, O., Chernov, V., Kemp, R. B., 2004. Effect of induced changes in membrane permeability on the defence response of *Chlorella vulgaris* to infection by *Acholeplasma laidlawii*. *Thermochim. Acta* 422, 95-100.
- Lu, L., Hackett, F., Mincey, A., Lai, H., Campochiaro, P. A., 2006. Effects of different types of oxidative stress in RPE cells. *J. Cell. Physiol.* 206, 119-125.
- Luciani, F., Spada, M., De Milito, A., Molinari, A., Rivoltini, L., Montinaro, A., Marra, M., Lugini, L., Logozzi, M., Lozupone, F., Federici, C., Iessi, E., Parmiani, G., Arancia, G., Belardelli, F., Fais, S., 2004. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1702–1713.
- Lürling, M., Roessink, I., 2006. On the way to cyanobacterial blooms: impact of the herbicide metribuzin on the competition between a green alga (*Scenedesmus*) and a cyanobacterium (*Microcystis*). *Chemosphere* 65, 618-626.
- Ma, J., Chen, J., 2005. How to accurately assay the algal toxicity of pesticides with low water solubility. *Environ. Pollut.* 136, 267-273.
- Macinnis-Ng, C. M. O., Ralph, P. J., 2003. Short-term impact and recovery of *Zostera capricorni* photosynthesis after herbicide exposure. *Aquat. Bot.* 76, 1-15.
- Mackay, D., Fraser, A., 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environ. Pollut.* 110, 375-391.
- Madshus, I. H., 1988. Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem. J.*

250, 1–8.

Mallick, N., Mohn, F. H., 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 64-69.

Marconi R., Lodmell, J., Hill W., 1990. Identification of a rRNA / Chloramphenicol interaction site within then peptidyltransferase center of the 50S subunit of the *Escherichia coli* ribosome. *J. Biol. Chem.* 265, 7894-7899.

Marino, M. L., Fais, S., Djavaheri-Mergny, M., Villa, A., Meschini, S., Lozupone, F., Venturi, G., Della Mina, P., Pattingre, S., Rivoltini, L., Codogno, P., De Milito, A., 2010. Proton pump inhibition induces autophagy as a survival mechanism following oxidative stress in human melanoma cells. *Cell. Death. Dis.* 1, e87.

Martínez-Bueno, M. J., Gómez, M. J., Herrera, S., Hernando, M. D., Agüera, A., Fernández-Alba, A. R., 2012. Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: two years pilot Survey monitoring. *Environ. Pollut.* 164, 267–273.

Mason, D. J., Allman, R., Stark, J. M., Lloyd, D., 1994. Rapid estimation of bacterial antibiotic susceptibility with flow cytometry. *J. Microsc.* 176, 8–16.

Mayfield, S. P., Yohn, C. B., Cohen, A., Danon, A., 1995. Regulation of chloroplast gene expression. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 46, 147-166.

McFadden, G. I., Roos, D. S., 1999. Apicomplexan plastids as drug targets. *Trends Microbiol.* 7, 328-333.

Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Informe anual del Sistema Nacional de Salud. Madrid, 2015.  
[http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/tablasEstadisticas/Inf\\_Anuar\\_SNS\\_2015.1.pdf](http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/tablasEstadisticas/Inf_Anuar_SNS_2015.1.pdf)

Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405-410.



- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9, 490-498.
- Møller, I. M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 561-591.
- Monk, B. C., Mason, A. B., Abramochkin, G., Haber, J. E., Seto-Young, D., Perlin, D. S., 1995. The yeast plasma membrane proton pumping ATPase is a viable antifungal target. I. Effects of the cysteine-modifying reagent omeprazole. *Biochim. Biophys. Acta* 1239, 81-90.
- Montes-Grajales, D., Fennix-Agudelo, M., Miranda-Castro, W., 2017. Occurrence of personal care products as emerging chemicals of concern in water resources: A review. *Sci. Total Environ.* 595, 601–614.
- Moreno-Garrido, I., Lubián, L. M., Soares, A., 2000. Influence of cellular density on determination of EC<sub>50</sub> in microalgal growth inhibition tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47, 112-116.
- Mullaney, P. F., Van Dilla, M. A., Coulter, J. R., 1969. Cell sizing: a light scattering photometer for rapid volume determination. *Rev. Sci. Instrum.* 40, 1029-1034.
- Musgrove, E., Rugg, C., Hedley, D., 1986. Flow cytometric measurement of cytoplasmic pH: a critical evaluation of available fluorochromes. *Cytometry* 7, 347-355.
- Nancharaiah, Y. W., Rajadurai, M., Venugopalan, V. P., 2007. Single cell level microalgal ecotoxicity assessment by confocal microscopy and digital image analysis. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2617-2621.
- Negreira, N., Rodríguez, I., Ramil, M., Rubí, E., Cela, R., 2009. Sensitive determination of salicylate and benzophenone type UV filters in water samples using solid-phase microextraction, derivatization and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 638, 36–44.

- Nicholls, D. G., 2004. Mitochondrial membrane potential and aging. *Aging Cell* 3, 35–40.
- 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.
- Noël, J., Pouysségur, J., 1995. Hormonal regulation, pharmacology and membrane sorting of vertebrate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms. *Am. J. Physiol.* 268, C283–296.
- OECD 201, 2011. Alga Growth Inhibition Test (201). OECD Guideline for Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- Ohnuma, K., Yomo, T., Asashima, M., Kaneko, K., 2006. Sorting of cells of the same size, shape, and cell cycle stage for a single cell level assay without staining. *BMC Cell Biol.* 7, 25-36.
- Ormerod, M. G., 2008. Flow cytometry: A basic introduction. <http://flowbook.denovosoftware.com/> 116 pp.
- Ortiz de García, S., Pinto, G., García Encina, P., Irusta Mata, R., 2013. Consumption and occurrence of pharmaceutical and personal care products in the aquatic environment in Spain. *Sci. Total Environ.* 444, 451–465.
- Orvos, D., Versteeg, D., Inauen, J., Capdevielle, M., Rothenstein, A., Cunningham, V., 2002. Aquatic toxicity of triclosan. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1338-1349.
- Ozkan, P. y Mutharasan, R., 2002. A rapid method for measuring intracellular pH using BCECF-AM. *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 143-148.
- Palmer, H., Ohta, M., Watanabe, M., Suzuki, T., 2002. Oxidative stress induced cellular damage caused by UV and methylviologen in *Eugena gracilis* and its suppression with rutin. *J. Photochem. Photobiol. B* 67, 116-129.
- Palmgren, M. G., Buch-Pedersen, M. J., Moller, A. L., 2003. Mechanism of proton

- pumping by plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Role of residues in transmembrane segments 5 and 6. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 5, 188–197.
- Papadimitriou, K., Pratsinis, H., Nebe-von-Caron, G., Kletsas, D., Tsakalidou, E., 2006. Rapid assessment of the physiological status of *Streptococcus macedonicus* by flow cytometry and fluorescent probes. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 197-205.
- Pascoe, D., Wenzel, A., Janssen, C., Girling, A. E., Jüttner, I., Fliedner, A., Blockwell, S. J., Maund, S. J., Taylor, E. J., Diecrich, M., Persoone, G., Verhelst, P., Stephenson, R. R., Crossland, N. O., Mitchell, G. C., Pearson, N., Tattersfield, L., Lay, J. P., Peither, A., Neumeier, B. y Velletti, A. R., 2000. The development of toxicity tests for freshwater pollutants and their validation in stream and pond mesocosms. *Water Res.* 34, 2323-2329.
- Peck, A. M., 2006. Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 907–939.
- Pedersen, P. L., 2007. Transport ATPases into the year 2008: A brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39, 349–355.
- Pérez-Sala, D., Collado-Escobar, D., Mollinedo, F., 1995. Intracellular alkalinization suppresses lovastatin-induced apoptosis in HL-60 cells through the inactivation of a pH-dependent endonuclease. *J. Biol. Chem.* 270, 6235–6242.
- Perla, V., Perrin, N. A., Greenlee, A. R., 2008. Paraquat toxicity in a mouse embryonic stem cell model. *Toxicol. In Vitro* 22, 515-524.
- Perry, S. W., Norman, J. P., Barbieri, J., Brown, E. B., Harris, A., 2011. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* 50, 98–115.
- Petersen, S., Kusk, K. O., 2000. Photosynthesis tests as an alternative to growth tests for hazard assessment of toxicant. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 152-

157.

- Peterson, S. M., Stauber, J. L., 1996. New algal enzyme bioassay for the rapid assessment of aquatic toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 750-757.
- Petrović, M., Gonzalez, S., Barceló, D., 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC - Trends in Anal. Chem.* 22, 685–696.
- Phan, T. N., Marquis, R. E., 2006. Triclosan inhibition of membrane enzymes and glycolysis of *Streptococcus mutans* in suspensions and biofilms. *Can. J. Microbiol.* 52, 977-983.
- Poiger, T., Buser, H. R., Balmer, M. E., Bergqvist, P. A., Müller, M. D., 2004. Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. *Chemosphere* 55, 951–63.
- Pokora, W., Tukaj, Z., 2010. The combined effect of anthracene and cadmium on photosynthetic activity of three *Desmodesmus (Chlorophyta)* species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1207-1213.
- Poot, M., Pierce, R. H., 2001. Analysis of mitochondria by flow cytometry. En: *Cytometry. Part B.* Darzynkiewicz, Z., Crissman, H. A., Robinson, J. P. (Eds.) Academic Press, London. pp. 496-512.
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Abalde, J., Cid, Á., 2009a. Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat. *Environ. Int.* 35, 240-247.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2009b. The herbicide paraquat induces alterations in the elemental and biochemical composition of non-target microalgal species. *Chemosphere* 76, 1440-1444.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2011. Characterization of cell response in *Chlamydomonas moewusii* cultures exposed to the herbicide paraquat: Induction of chlorosis. *Aquat. Toxicol.* 102, 10–17.

- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2012. Screening acute cytotoxicity biomarkers using a microalga as test organism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 86, 219-226.
- Pratt, W., 1981. *Quimioterapia de la infección*. Oxford University Press, New York. 431 pp.
- Qu, B., Li, Q. T., Wong, K. P., Tan, T. M. C., Halliwell, B., 2001. Mechanism of clofibrate hepatotoxicity: mitochondrial damage and oxidative stress in hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 659-669.
- Rabinovitch, P. S., June, C. H., 1990. Intracellular ionized calcium, membrane potential, and pH. En: *Flow cytometry. A practical approach*. Ormerod, M. G. (Ed.) Oxford University Press, Oxford. pp. 161-185.
- Raha, S., Robinson, B. H., 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.* 25, 502-508.
- Rahman, M., 2014. *Introduction to Flow Cytometry*. AbD Serotec, Bio-Rad. Kidlington, Oxford. 34 pp.
- Rand, G. M., 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, environmental fate, and risk assessment*. 2ª ed. Taylor & Francis, London. 1148 pp.
- Raven, J. A., 1984. *Energetics and Transport in Aquatic Plants*. MBL Lectures in Biology. Vol. 4. Alan R. Liss, New York. 587 pp.
- Raven, J. A., Geider, R. J., 1988. Temperature and algal growth. *New Phytol.* 110, 441-461.
- Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas.
- Rees, T. A., Cresswell, R. C., Syrett, P. J., 1980. Sodium-dependent uptake of nitrate and urea by marine diatom. *Biochim. Biophys. Acta* 596, 141-144.
- Regan, D. L., 1988. Other micro-algae. En: *Micro-algal Biotechnology*. Borowitzka, M. A. y Borowitzca, L. J. (Eds.). Cambridge Univ. Press, Cambridge. pp. 122-150.

- 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., Brookes, J. D., 2002. Algal esterase activity as a bioassay of environmental degradation in a freshwater creek. *Aquat. Toxicol.* 59, 209-223.
- Reglamento (CE) Nº 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos.
- Reglamento (CE) Nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 18 de diciembre de 2006 relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) Nº 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) Nº 1488/94 de la Comisión, así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión.
- Reglamento (CEE) Nº 2377/90 del Consejo de 26 de junio de 1990 por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal.
- Reiner, J. L., Kannan, K., 2006. A survey of polycyclic musks in selected household commodities from the United States. *Chemosphere* 62, 867–873.
- Rimkus, G. G., 1999. Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment. *Toxicol. Lett.* 111, 37–56.
- Rioboo, C., Prado, R., Herrero, C., Cid, Á., 2007. Population growth study of the rotifer *Brachionus sp.* fed with triazine-exposed microalgae. *Aquat. Toxicol.* 83, 247-253.
- Rodea-Palomares, I., González-Pleiter, M., Martín-Betancor, K., Rosal, R., Fernández-

- Piñas, F., 2015. Additivity and interactions in ecotoxicity of pollutant mixtures: some patterns, conclusions, and open questions. *Toxics* 3, 342–369.
- Rodil, R., Quintana, J. B., Concha-Graña, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., 2012. Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). *Chemosphere* 86, 1040-1049.
- Roos, W., Viehweger, K., Dordschbal, B., Schumann, B., Evers, S., Steighardt, J., Schwartze, W., 2006. Intracellular pH signals in the induction of secondary pathways – The case of *Eschscholzia californica*. *J. Plant Physiol.* 163, 369-381.
- Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J. A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M. J., Agüera, A., Fernández-Alba, A. R., 2010. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res.* 44, 578–588.
- Rosenwasser, S., van Creveld, G. S., Schatz, D., Malitsky, S., Tzfadia, O., Aharoni, A., Levin, Y., Gabashvili, A., Feldmesser, E., Vardi, A., 2014. Mapping the diatom redox-sensitive proteome provides insight into response to nitrogen stress in the marine environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2740–2745.
- Royall, J. A., Ischiropoulos, H., 1993. Evaluation of 20,70-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 302, 348-335.
- Rutherford, A. W., Krieger-Liszkay, A., 2001. Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends Biochem. Sci.* 6, 648-653.
- Sachs, G., Shin, J. M., Briving, C., Wallmark, B., Hersey, S., 1995. The pharmacology of the gastric acid pump: The H<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 277-305.
- Saladin, G., Magné, C., Clément, C., 2003. Impact of flumioxazin herbicide on growth and carbohydrate physiology in *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Rep.* 21, 821-827.
- Sánchez-Avila, J., Tauler, R., Lacorte, S., 2012. Organic micropollutants in coastal

- waters from NW Mediterranean Sea: sources distribution and potential risk. *Environ. Int.* 46, 50–62.
- SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), 2011. European Commission. The European Cosmetics Association, COLIPA n° P32. Opinion on triclosan, ADDENDUM to the SCCP Opinion on Triclosan (SCCP/1192/08) from January 2009. March, 2011.
- Schmidt, A. S., Bruun, M. S., Dalsgaard, I., Larsen, J. L., 2001. Incidence, distribution, and spread of tetracycline determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5675– 5682.
- Schneider, J., 1994. Problems related to the usage of veterinary drugs in aquaculture - a review. *Quim. Anal.* 13 (Suppl. 1), S34-S42.
- Schnürer, J., Rosswall, T., 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1256-1261.
- Schreiber, U., Quayle, P., Schmidt, S., Escher, B. I., Mueller, J. F., 2007. Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwell chlorophyll fluorescence imaging. *Biosens. Bioelectron.* 22, 2554-2563.
- Segner, H., 2011. Moving beyond a descriptive aquatic toxicology: The value of biological process and trait information. *Aquat. Toxicol.* 105, 50-55.
- Shalzman, G. C., Crowell, J. M., Martin, J. C., 1975. Cell identification by laser light scattering: identification and separation of unstained leukocytes. *Acta Cytol.* 19, 374-378.
- Shapiro, H. M., 1995. *Practical Flow Cytometry*. 3rd edition. Willey-Lyss Inc., New York. 542 pp.
- Singer, H., Muller, S., Tixier, C., Pillonel, L., 2002. Triclosan: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment. Field measurements in



- wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4998-5004.
- Singh, L. J., Tiwari, D. N., 1988. Effects of selected rice-field herbicides on photosynthesis, respiration, and nitrogen assimilating enzyme systems of paddy soil diazotrophic cyanobacteria. *Pest. Biochem. Physiol.* 31, 120-128.
- Smith, P., Hiney, M. P. y Samuelsen, O. B., 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annu Rev. Fish Dis.* 4, 273–313.
- Sobrinho, C., Montero, O., Lubián, L. M., 2004. UV-B radiation increases cell permeability and damages nitrogen incorporation mechanism in *Nannochloropsis gaditana*. *Aquat. Sci.* 66, 421-429.
- Sobrinho, C., Montero, O., Lubián, L. M., 2005. Effect of UV-A and UV-B on diel patterns of growth and metabolic activity in *Nannochloris atomus* cultures assessed by flow cytometry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 293, 29-35.
- Sohal, R. S., 2002. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 37-44.
- Sommer, C., 2004. The role of musks and musk compounds in the fragrance industry. En: Rimkus, Gerhard G. (Ed.) *Synthetic Musk Fragrances in the Environment. The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 3, Part X*, pp. 1–16.
- Stauber, J. L., Franklin, N. M., Adams, M. S., 2002. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. *Trends Biotechnol.* 20, 141-143.
- Sterbini, F. P., Palladini, A., Masucci, L., Cannistraci, C. V., Pastorino, R., Ianiro, G., Bugli, F., Martini, C., Ricciardi, W., Gasbarrini, A., Sanguinetti, M., Cammarota, G., Posteraro, B., 2016. Effects of proton pump inhibitors on the gastric mucosa-associated microbiota in dyspeptic patients. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 6633–6644.
- Storck, V., Karpouzias, D. G., Martin-Laurent, F., 2017. Towards a better pesticide

- policy for the European Union. *Sci. Total Environ.* 575, 1027-1033.
- Strom, D., Ralph, P. J., Stauber, 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.
- Suntres, Z. E., 2002. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology* 180, 65-77.
- Sweetlove, L. J., Foyer, C. H., 2004. Roles for reactive oxygen species and antioxidants in plant mitochondria. En: Day, D. A., Millar, A. H., Whelan, J. Eds, *Plant Mitochondria: From Genome to Function*, Vol. 1, *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 307-320.
- Tadonlélé, R. D., LeBerre, B., Perreau, F., Humbert, J., 2009. Responses of lake bacterioplankton activities and composition to the herbicide diuron. *Aquat. Toxicol.* 94, 103-113.
- Tarazona, I., Chisvert, A., León, Z., Salvador, A., 2010. Determination of hydroxylated benzophenone UV filters in sea water samples by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 4771-4778.
- Tarpey, M. M., Fridovich, I., 2001. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Cir. Res.* 89, 224-236.
- Taylor, A. R., Brownlee, C., Wheeler, G. L., 2012. Proton channels in algae: reasons to be excited. *Trends Plant Sci.* 17, 675-684.
- Tosello, M. E., Biasoli, M. S., Luque, A. G., Magaró, H. M. y Krapp, A. R., 2008. Oxidative stress response involving induction of protective enzymes in *Candida albicans*. *Med. Mycol.* 45, 535-540.
- Truhaut, R., 1977. *Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1977, 151-173.

- Uriarte, I., Farias, A., Castilla, J. C., 2001. Effect of antibiotic treatment during larval development of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquac. Eng.* 25, 139–147.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178-189.
- Vallotton, N., Moser, D., Eggen, R. I. L., Junghans, M., Chèvre, N., 2008. S-metolachlor pulse exposure on the alga *Scenedesmus vacuolatus*: effects during exposure and the subsequent recovery. *Chemosphere* 73, 395-400.
- Vamanu, C. I., Cimpan, M. R., Hol, P. J., Sornes, S., Lie, S. A., Gjerdet, N. R., 2008. Induction of cell death by TiO<sub>2</sub> nanoparticles: studies on a human monoblastoid cell line. *Toxicol. In Vitro* 22, 1689-1696.
- van Creveld, S. G., Rosenwasser, S., Schatz, D., Koren, I., Vardi, A., 2014. Early perturbation in mitochondria redox homeostasis in response to environmental stress predicts cell fate in diatoms. *ISME J.* 9, 1–11.
- van den Hoek, C., Mann, D. G., Jahns, H. M., 1995. *Algae. An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge. 623 pp.
- van Wezel, A. P., van Vlaardingen, P., 2004. Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquat. Toxicol.* 66, 427-444.
- Vavilala, S. L., Gawde, K. K., Sinha, M., D'Souza, J. S., 2015. Programmed cell death is induced by hydrogen peroxide but not by excessive ionic stress of sodium chloride in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Phycol.* 50, 422-438.
- Vega, J. M., Garbayo, I., Domínguez, M. J., Vígara, J., 2006. Effect of abiotic stress on photosynthesis and respiration in *Chlamydomonas reinhardtii*: Induction of oxidative stress. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 163-167.
- Vega, J. M., Rubiales, M. A., Vílchez, C., Vígara, J., 2005. Effect of abiotic stress on

- photosynthesis, respiration and antioxidant system in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phyton* 45, 97-106.
- Veldhuis, M. J. W., Kraay, G. W., 2000. Application of flow cytometry in marine phytoplankton research: current applications and future perspectives. *Sci. Mar.* 64, 121-134.
- Verkhatsky, A., 2007. Calcium and cell death. *Subcell. Biochem.* 45, 465–480.
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Zambello, E., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment: a review. *Sci. Total Environ.* 429, 123–155.
- Vesper, B. J., Jawdi, A., Altman, K. W., Haines III, G. K., Tao, L., Radosevich, J. A., 2009. The effect of proton pump inhibitors on the human microbiota. *Curr. Drug Metab.* 10, 84–89.
- Vicente, J. A. F., Peixoto, F., Lopes, M. L., Madeira, V. M. C., 2001. Differential sensitivities of plant and animal mitochondria to the herbicide paraquat. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15, 322-330.
- Villalain, J., Mateo, C. R., Aranda, F. J., Shapiro, S., Micol, V., 2001. Membranotropic effects of the antibacterial agent triclosan. *Arch. Biochem. Biophys* 390, 128-136.
- Wallace, D. C., 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39, 359-407.
- Walrand, S., Valeix, S., Rodríguez, C., Ligoit, P., Chassagne, J., Vasson, M., 2003. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin. Chim. Acta* 331, 103-110.
- Walsh, G. E., Merrill, R. G., 1984. Algal bioassays of industrial and energy process effluents. En: *Algae as Ecological Indicators*. Shubert, L. E. (Ed.) Academic Press, London. pp. 329-360.

- Wei, M. K., Wu, Q. P., Huang, Q., Zhang, J. M., 2008. Plasma membrane damage to *Candida albicans* caused by chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) Lett. Appl. Microbiol. 47, 67-73.
- Weir, I. E., Pham, N. A., Hedley, D. W., 2003. Oxidative stress is generated via the mitochondrial respiratory chain during plant cell apoptosis. Cytometry A 54A, 109-117.
- Wilhem, J., Vytasek, R., Ostádalová, I., Vajner, L., 2009. Evaluation of different methods detecting intracellular generation of free radicals. Mol. Cell Biochem. 328, 167-176.
- Wu-Hsiung, H., Yahong, W., Askari, A., 1992. (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase: inactivation and degradation induced by oxygen radicals. Int. J. Biochem. 24, 621-626.
- Yang, S., Wu, R. S. S., Kong, R. Y. C., 2002. Physiological and cytological responses of the marine diatom *Skeletonema costatum* to 2,4-dichlorophenol. Aquat. Toxicol. 60, 33-41.
- Yu, Y., Kong, F., Wang, M., Qian, L., Shi, X., 2007. Determination of short-term copper toxicity in a multispecies microalgal population using flow cytometry. Ecotoxicol. Environ. Saf. 66, 49-56.
- Zhang, Y. M., Lu, Y. J., Rock, C. O., 2004. The reductase steps of the type II fatty acid synthase as antimicrobial targets. Lipids 39, 1055–1060.



**ANEXOS**

---





---

**Anexo I. Publicaciones**

- Bautista-Chamizo, E., Sendra, M., Cid, Á., **Seoane, M.**, De Orte, M. R., Riba, I. (2018). Will temperature and salinity changes exacerbate the effects of seawater acidification on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*? *Science of the Total Environment*, 634, 87-94. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.314
- **Seoane, M.**, Esperanza, M., Cid, Á. (2017). Cytotoxic effects of the proton pump inhibitor omeprazole on the non-target marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Aquatic Toxicology*, 191, 62-72. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.08.001
- Esperanza, M., Houde, M., **Seoane, M.**, Cid, Á., Rioboo, C. (2017). Does a short-term exposure to atrazine provoke cellular senescence in *Chlamydomonas reinhardtii*?. *Aquatic Toxicology*, 189, 184-193. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.06.015
- **Seoane, M.**, Esperanza, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. (2017). Flow cytometric assay to assess short-term effects of personal care products on the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Chemosphere*, 171, 339-347. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.12.097
- Esperanza, M., **Seoane, M.**, Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. (2016). Early alterations on photosynthesis-related parameters in *Chlamydomonas reinhardtii* cells exposed to atrazine: A multiple approach study. *Science of the Total Environment*, 554-555, 237-245. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.02.175
- 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. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.05.012

- **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. doi: 10.1016/j.marenvres.2014.07.011

---

**Anexo II. Comunicaciones a congresos**

- **Seoane, M.**, Esperanza, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. Póster: Acute toxicity of omeprazole on the microalga *Tetraselmis suecica*. VII congreso de la FEMS (Federation of European Microbiological Societies) y XXVI congreso de la SEM (Sociedad Española de Microbiología). 9-13 de julio de 2017. Valencia (España).
- Esperanza, M., **Seoane, M.**, Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. Póster: Microalgal premature senescence provoked by chemical stress. VII congreso de la FEMS (Federation of European Microbiological Societies) y XXVI congreso de la SEM (Sociedad Española de Microbiología). 9-13 de julio de 2017. Valencia (España).
- **Seoane, M.**, Esperanza, M., Herrero, C., Cid, Á. Póster: Reactive oxygen species overproduction on microalgal cells exposed to diverse pollutants. XV congreso de la SIC (Sociedad Ibérica de Citometría). 25-27 de mayo de 2017. Lisboa (Portugal).
- Esperanza, M., **Seoane, M.**, López, I., Rioboo, C. Póster: Influence of abscisic acid (ABA) on tolerance to heat shock in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. XV congreso de la SIC (Sociedad Ibérica de Citometría). 25-27 de mayo de 2017. Lisboa (Portugal).
- Esperanza, M., **Seoane, M.**, Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. Póster: Proteomic analysis of atrazine stress response in *Chlamydomonas reinhardtii*. VII Congreso Europeo de Protistología (ECOP). 5-10 de septiembre de 2015. Sevilla (España).
- **Seoane, M.**, Esperanza, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. Póster: Physiological alterations on the marine microalga *Tetraselmis suecica* exposed to the UV filter Benzophenone-3. 10º Congreso Ibérico y 7º Iberoamericano de Contaminación y Toxicología Ambiental (CICTA 2015). 14-17 de julio de 2015. Vila Real (Portugal).

- Esperanza, M., **Seoane, M.**, Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. Póster y comunicación oral: Análisis por RNA-Seq de la respuesta de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* al estrés producido por el herbicida atrazina. XXV Congreso de la SEM (Sociedad Española de Microbiología). 7-10 de julio de 2015. Logroño (España).
- Cid, Á., Prado, R., Rioboo, C., Esperanza, M., **Seoane, M.**, Herrero., C. Comunicación oral: Respuesta a estrés en microalgas: nuevos biomarcadores de citotoxicidad. XXV Congreso de la SEM (Sociedad Española de Microbiología). 7-10 de julio de 2015. Logroño (España).
- Esperanza, M., **Seoane, M.**, Rioboo, C. Herrero, C., Cid, Á. Póster: Efectos a corto plazo del herbicida atrazina sobre la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. XIV Congreso de la Sociedad Ibérica de Citometría (SIC). 4-6 de junio de 2015. Las Palmas de Gran Canaria (España).
- **Seoane, M.**, Esperanza, M., Rioboo, C., Cid., Á. Comunicación oral: Alteración de parámetros fotosintéticos en la microalga marina *Tetraselmis suecica* en presencia de tres antibióticos utilizados en acuicultura. X Congreso de Microbiología del Medio Acuático de la SEM. 7-9 de septiembre de 2014. Elche, Alicante (España).
- Esperanza, M., **Seoane, M.**, Cid, Á., Herrero, C., Rioboo, C. Comunicación oral: Citotoxicidad ejercida por el herbicida paraquat en la microalga de agua dulce *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard. X Congreso de Microbiología del Medio Acuático de la SEM. 7-9 de septiembre de 2014. Elche, Alicante (España).
- **Seoane, M.**, Rioboo, C., Cid, Á. Póster: Toxicity of three antibiotics used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. International Meeting on Marine Research (IMMR'14). 10-11 de julio de 2014. Peniche (Portugal).



