

**EFFECTO DEL CONTAMINANTE BISFENOL A, A
DISTINTAS TEMPERATURAS, SOBRE LA
MICROALGA MARINA *TETRASELMIS SUECICA***

EFFECT OF THE CONTAMINANT BISPHENOL A,
AT DIFFERENT TEMPERATURES, ON THE
MICROALGAE MARINE *TETRASELMIS SUECICA*

M^a Melisa Lorenzo Rodríguez

Dirigido por Ángeles Cid Blanco y Marta Seoane Méndez

2017/2018

ÁREA DE MICROBIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a mi tutora Ángeles Cid, por ayudarme a llevar a cabo este trabajo y poder aprender un poco más en la rama de la investigación. A Marta por guiarme en el laboratorio y en general al Área de Microbiología por su buen trato.

Gracias a mi tío Suso por inculcarme tan importantes valores que me hicieron llegar hasta aquí, a mi madre por todo su cariño, a mi padre por enviarme fuerzas, y a mi gran familia, por apoyarme siempre en todo y enseñarme que rendirse no es una opción. A todos mis amigos y a mis biólogas favoritas que me acompañaron en este bonito camino.

ÍNDICE

<i>RESUMEN</i>	4
<i>INTRODUCCIÓN</i>	6
<i>OBJETIVO</i>	8
<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	9
<i>ESPECIE UTILIZADA</i>	9
<i>BISFENOL A</i>	9
<i>CULTIVO MICROALGAL</i>	11
<i>DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR</i>	11
<i>DISEÑO EXPERIMENTAL</i>	13
<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	13
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	13
<i>CRECIMIENTO CELULAR</i>	14
<i>DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS</i>	17
<i>CONCLUSIÓN</i>	20
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	22

RESUMEN

En los últimos años, el desarrollo de nuevos y más sensibles métodos analíticos ha permitido alertar de la presencia de contaminantes emergentes en aguas. Su impacto lleva a cabo cambios en la composición de individuos de la comunidad acuática, cambios en los organismos dominantes de un hábitat y empobrecimiento de especies. Muchos de estos contaminantes son disruptores endocrinos, como el bisfenol A (BPA). Las microalgas juegan un papel fundamental para el equilibrio del ecosistema acuático y son un buen indicador de toxicidad del medio.

En el presente trabajo se estudia el posible efecto tóxico que ejerce el bisfenol A en *Tetraselmis suecica*. Se realizaron cultivos de esta microalga a diferentes concentraciones de BPA (3, 4, 5 y 6 mg l⁻¹) durante 72 h y a dos temperaturas (18 y 22 °C) respectivamente. Además se determinó el contenido celular de pigmentos (clorofila *a* y *b* y carotenoides). El crecimiento celular y la cantidad de pigmentos muestran diferencias en los cultivos expuestos a BPA y también varían dependiendo de las temperaturas en las que se cultive. Por esto, se puede determinar que *T.suecica* es sensible a la toxicidad del BPA y el aumento de temperatura influye negativamente. Debido a los parámetros analizados se deduce que *T. suecica* sería un buen indicador de calidad ambiental.

Palabras clave: microalga, *Tetraselmis suecica*, bisfenol A, toxicidad, crecimiento, clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides

RESUMO

Nos últimos anos, o desenvolvemento de novos e máis sensibles métodos analíticos permitiu alertar da presenza de contaminantes emerxentes nas augas. O seu impacto leva a cabo cambios na composición dos individuos da comunidade acuática, cambios nos organismos dominantes dun hábitat e empobrecemento de especies. Moitos de estes contaminantes son disruptores endócrinos, como o bisfenol A (BPA). As microalgas xogan un papel fundamental para o equilibrio do ecosistema acuático e son un bo indicador de toxicidade do medio.

No presente traballo estúdiase o posible efecto tóxico que exerce o bisfenol A en *Tetraselmis suecica*. Realizáronse cultivos desta microalga a diferentes concentracións de BPA (3, 4, 5 y 6 mg l⁻¹) durante 72 h e a dúas temperaturas (18 e

22 °C) respectivamente. Ademáis, determinouse o contido celular e de pigmentos (clorofila *a* y *b* y carotenoides). O crecemento celular e a cantidade de pigmentos mostran diferencias nos cultivos expostos o BPA e tamén varían dependendo das temperaturas nas que se cultive. Por iso, pódese determinar que *T. suecica* é sensible a toxicidade do BPA e o aumento da temperatura influe negativamente. Debido os parámetros analizados dedúcese que *T. suecica* é bo indicador de calidade ambiental.

Palabras chave: microalga, *Tetraselmis suecica*, bisfenol A, toxicidade, crecemento, clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides

ABSTRACT

In recent years, the development of new and more sensitive analytical methods has made it possible to alert the presence of emerging contaminants in water. Their impact has caused changes in the composition of individuals in the aquatic community, changes in the dominant organisms of a habitat and impoverishment of species. Many of these pollutants are endocrine disrupters, such as Bisphenol A (BPA). Microalgae play a fundamental role in the equilibrium of the aquatic ecosystem and are a good indicator of medium toxicity.

In this paper we study the possible toxic effect exerted by bisphenol A in *Tetraselmis suecica*. Cultives of these microalgae were carried out at different concentrations of BPA (3, 4, 5 and 6 mg L⁻¹) during 72 h and at two temperatures (18 and 22 ° C) respectively. In addition, the cellular content of pigments (chlorophyll *a* and *b* and carotenoids) was determined. Cell growth and the amount of pigments show differences in crops exposed to BPA and also vary depending on the temperatures in which they are cultivated. Therefore, it can be determined that *T. suecica* is sensitive to the toxicity of BPA and that increase in temperature influences negatively. Due to the analyzed parameters, the fact that *T. suecica* would be a good indicator of environmental quality.

Key words: microalgae, *Tetraselmis suecica*, bisphenol A, toxicity, growth, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, carotenoids

INTRODUCCIÓN

Las algas se utilizaron a lo largo del tiempo por las distintas civilizaciones para la alimentación humana y animal. Las microalgas o algas microscópicas son cultivadas de manera industrial para la producción de proteínas, vitaminas y otros suplementos nutritivos, y además han sido utilizadas en simbiosis con bacterias para la remoción de fosfatos y nitratos de aguas residuales como biofertilizantes (Mora & Moronta, 2005).

Si se conociese la respuesta al crecimiento de una amplia gama de relaciones de nutrientes y condiciones de salinidad en cultivos discontinuos, se podría establecer parámetros para una producción en masa que nos permitiera obtener la máxima velocidad de crecimiento, rentabilidad y concentración de proteínas de estas algas (Fabregas *et al.*, 1984).

Se utilizan las microalgas como cultivo auxiliar en los cultivos intensivos de bivalvos, y esto ha llevado a una monitorización de las características nutritivas que estas células fitoplanctónicas deben cumplir para satisfacer los requerimientos nutritivos de larvas y postlarvas (Farías, 2002).

También decir que las algas microscópicas han merecido considerable atención por su potencialidad como fuente de biodiesel, aportando la posibilidad de suplir de manera parcial la escasez del suministro de petróleo, además de ser una buena alternativa a los precios tan elevados de materias primas tradicionales para la obtención de biocombustibles, como la soja, la caña de azúcar, palma aceitera, colza, grasas animales, residuos de grasas, entre los más representativos (Silva *et al.*, 2011) .Por lo que su producción a gran escala despertó un gran interés (Cid *et al.*, 1992).

En los últimos años, el desarrollo de nuevos y más sensibles métodos analíticos ha permitido alertar de la presencia de contaminantes emergentes en aguas. Los vertidos de los compuestos emergentes pueden suponer un problema sanitario y ambiental que aún no está investigado ni regulado suficientemente. No son contaminantes necesariamente persistentes, pero solubles en agua, por lo que son capaces de penetrar en todas las etapas del ciclo del agua. La principal fuente de entrada en el

medio acuático es a través de aguas residuales, la agricultura y ganadería, así como pesticidas y fármacos. (García Gutiérrez, 2018)

El impacto de los diferentes contaminantes en las microalgas llevaría a cambios en la composición de especies de la comunidad acuática, cambios de los organismos dominantes en un hábitat y empobrecimiento de especies (Pérez, 2005).

Además los efectos de la contaminación química del agua son múltiples; cabe destacar: acción tóxica y cancerígena, incidencia en los alimentos, limitación del uso del agua con fines recreativos y reducción de su uso para la industria. Los riesgos son difíciles de precisar, ya que las dosis tóxicas pueden ser muy pequeñas y aumentar el problema la presencia de otros contaminantes (Damià & López, 2008).

Muchos de estos contaminantes emergentes son disruptores endocrinos como es el bisfenol-A. Se ha acuñado el término de disruptores endocrinos para definir los compuestos químicos, contaminantes medioambientales, que interaccionan con el sistema endocrino (Olea, 2001).

Las microalgas marinas juegan un papel fundamental para el mantenimiento del equilibrio de ecosistema acuático, al ser los actores clave en la producción y transferencia de la energía en el medio marino (Ebenezer & Ki, 2016).

La contaminación alimentaria puede ocurrir a través de la cadena trófica debido a productos con grandes cantidades de BPA, que pasan al medio ambiente. En la última década el BPA ha traído considerable atención porque es un modelo xenoestrógeno capaz de desencadenar trastornos reproductivos en los animales de laboratorio (Richter et al., 2007).

Una alternativa es utilizar plásticos libres de bisfenol A o productos que disminuyan la exposición de estos disruptores endocrinos (Ortega García *et al.*, 2002). Adicionalmente, no introducir envases de plástico en el microondas o lavavajillas, no envolver en rollos de plástico a los alimentos y evitar los productos enlatados (Díaz-Gómez *et al.*, 2013).

OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo es evaluar si el efecto tóxico del bisfenol A en la microalga marina *Tetraselmis suecica* se ve modificado por un aumento de temperatura.

Esto se lleva a cabo estudiando la citotoxicidad del BPA a diferentes concentraciones sobre *T.suecica* y a distintas temperaturas (18°C Y 22°C) y observar cómo afectan estos factores en el número de células, crecimiento celular y contenido celular de clorofilas *a* y *b* y carotenoides.

MATERIAL Y MÉTODOS

ESPECIE UTILIZADA

La especie utilizada en el presente estudio ha sido *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. Está clasificada en la división Chlorophyta, clase Prasinophyceae, orden Chlorodendrales, familia Chlorodendraceae.

Tetraselmis suecica es una microalga marina unicelular, cuyas células son verdes, solitarias, libres y móviles con forma ovoide o elipsoidal y aplanada transversalmente. Presentan cuatro flagelos isodinámicos, insertados en una depresión anterior, un núcleo central, un cloroplasto en copa, lobulado en la parte anterior, con un pirenoide basal rodeado de almidón y generalmente un estigma.

La reproducción ocurre por fisión longitudinal de las células, que adoptan el estado inmóvil; las células hijas pueden observarse completamente flageladas antes de su liberación de la teca parental (Pérez, 2005).



Figura 1. Fotografía de las células de la microalga marina *Tetraselmis suecica* realizada mediante microscopio óptico de contraste de fase con un aumento de 100x (Pérez, 2005).

BISFENOL A

El bisfenol A 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano es una sustancia química orgánica (monómero) conocida como BPA que se utiliza en la producción de plástico de policarbonato y resinas epoxi (Pérez Abejón, 2012).

También se utiliza en la fabricación de resinas de poliéster, polisulfona y poliacrilato y de retardantes de llama.

El policarbonato se utiliza en la fabricación de materiales en contacto con alimentos, como biberones, vajillas, utensilios de horno y microondas, envases de alimentos, botellas de agua, leche y otras bebidas, también en equipos de procesamiento y tuberías de agua.

Las resinas epoxi se usan como revestimiento de protección de diversas latas de alimentos y bebidas, y como revestimiento de las tapas metálicas de jarras y botellas de vidrio, incluidos los envases de las preparaciones para lactantes.

Estos usos provocan la exposición de los consumidores al BPA a través de la alimentación. Las ingestas alimentarias diarias, basadas en las concentraciones medidas en los alimentos, varían enormemente, pero se calcula que en Europa son de aproximadamente 0,2 µg/kg de peso corporal en los lactantes amamantados, 2,3 µg/kg de peso corporal en los lactantes alimentados con sucedáneos de la leche materna mediante biberones no fabricados con policarbonato, 11 µg/kg peso corporal en los lactantes alimentados con sucedáneos de la leche materna mediante biberones fabricados con policarbonato, y 1,5 µg/kg de peso corporal en adultos.

La evaluación de la exposición humana diaria al BPA en el grueso de la población mediante la biovigilancia de la excreción urinaria de metabolitos de BPA también varía enormemente, pero se calcula que llega hasta los 0,16 µg/kg de peso corporal en los Estados Unidos, y hasta los 0,04-0,08 µg/kg de peso corporal en el Japón.

Los valores obtenidos de la orina reflejan con mayor precisión las exposiciones reales, ya que los cálculos de la exposición alimentaria parten de un supuesto de una absorción al 100% y de exposición de "grandes consumidores" (OMS., 2009).

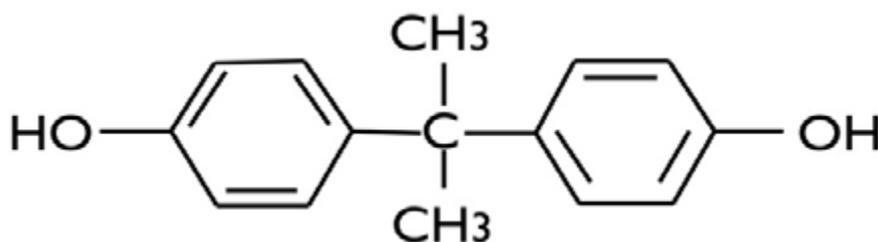


Figura 2. Estructura química del BPA (Juan-García *et al.*, 2015)

CULTIVO MICROALGAL

Los cultivos de *Tetraselmis suecica* se realizan en agua de mar filtrada por 5 µm y esterilizada en autoclave durante 20 min a 120°C. El medio de cultivo nutritivo empleado es Algal-1 (Fábregas, 1984) preparado a partir de una solución de macroelementos y otra de oligoelementos realizadas en agua destilada, que se esterilizan en autoclave. Posteriormente, se mezclan en condiciones de esterilidad y el medio se refrigera el medio a 4° C.

Los cultivos stock se mantienen en una cámara de cultivo en botellas *Pyrex* de 500 ml con aireación filtrada mediante filtros *Milipore FG* de 0,20 µm de poro. Las cámaras de cultivo presenta unas condiciones controladas de luz y temperatura, manteniendo una temperatura constante de 18±1°C y 22±°C respectivamente y una intensidad lumínica de 68,25 µm fotón m⁻² s⁻¹ proporcionada por tubos fluorescentes *Phillips TLD* de 36 W, con un ciclo de 24 h de periodos luz-oscuridad (12 h de luz- 12 h de oscuridad).

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

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR

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

Se calcula la tasa de crecimiento (µ) a las 72 h para las diferentes concentraciones de BPA en las dos temperaturas correspondientes (18±1°C y 22±°C) mediante la fórmula:

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

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

El cálculo de la concentración efectiva 50 para el crecimiento (EC 50, concentración que reduce en 50% un parámetro) se lleva a cabo a las 72 horas.

DETERMINACIÓN ESPECTOFOTOMÉTRICA DE LOS PIGMENTOS

En el análisis espectrofotométrico del contenido en pigmentos de *T. suecica* se recogen las células por centrifugación de un volumen determinado de cultivo de los ensayos en una centrífuga refrigerada Multifuge 3L-R Heraeus a 4500 rpm durante 15 min a 4°C. Se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet en un volumen conocido de acetona:metanol (2:1). Tras este paso se mantienen a una temperatura de 4°C durante 24 h y en oscuridad total para que la extracción sea completa. Pasado este tiempo se vuelve a centrifugar para retirar los restos celulares y recoger los pigmentos extraídos que se encuentran en el sobrenadante. Las lecturas de absorbancia se realizan a 647 y 664 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A, frente a un blanco de acetona:metanol (2:1).

El valor de los coeficientes y la longitud de onda a la cual se produce la máxima absorción van a variar en función del solvente utilizado. De los propuestos hasta la fecha, se han optado los de Jeffrey & Humphrey (Jeffrey & Humphrey, 1975) para las clorofilas, usando una mezcla de acetona:metanol (2:1) como solvente.

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

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

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

$$[\text{Carotenoides}] = 4 * A_{480}$$

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

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para evaluar la posible toxicidad del bisfenol A sobre la microalga *Tetraselmis suecica* se realizaron experiencias hasta las 72 horas en las que las células se expusieron a concentraciones de contaminante de 3 ; 4; 5 y 6 mg l⁻¹ tanto a 18±1°C como a 22±1°C. Se realizan también controles con cultivos sin contaminantes a las dos intervalos de temperatura. Todos los cultivos se establecen a partir de un inóculo en fase de crecimiento exponencial con una densidad celular inicial de 200.000 células ml⁻¹.

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

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

Para el análisis estadístico de los datos se emplea el programa Rcomander. En cada experiencia se estudia la posible interacción entre la temperatura y la concentración de bisfenol A (BPA), que se valora mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA I) con un nivel de confianza del 95% y se utiliza también el test de rango múltiple de Tukey. El test de Tukey se aplica en todos los casos con un nivel de significación de 0,05. El test se repite para cada temperatura. Se estudia la normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk, pero esta no es significativa, ya que el número de datos es pequeño para poder ajustarse a una normal, por lo que se utilizan test no paramétricos (Kruskal – Wallis).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CRECIMIENTO CELULAR

Uno de los parámetros estudiados en el presente trabajo es el crecimiento de *Tetraselmis suecica* a diferentes concentraciones del contaminante bisfenol A para ver cómo afecta a las células, y revelar el posible efecto tóxico. A pesar de la gran variedad de métodos cada vez más rápidos, sencillos y prácticos que hay en la actualidad, el crecimiento sigue siendo el parámetro más utilizado en los ensayos para determinar la toxicidad de los diversos contaminantes en las microalgas marinas (Van Wezel & Van Vlaardingen, 2004).

El bisfenol-A afecta al crecimiento de la microalga *Tetraselmis suecica* (Fig. 3). La densidad celular (número de células por ml de cultivo) disminuye a medida que aumenta la concentración de contaminante en el medio, efecto que ya se observa a las 24 h de exposición al contaminante. La densidad celular media alcanzada por los cultivos control a 18°C, no expuestos a contaminante, fue 42,78 células/ml, mientras que los cultivos expuestos a la máxima concentración ensayada alcanzaron una densidad celular de 19,17 células/ml, que es menos de la mitad de los cultivos control.

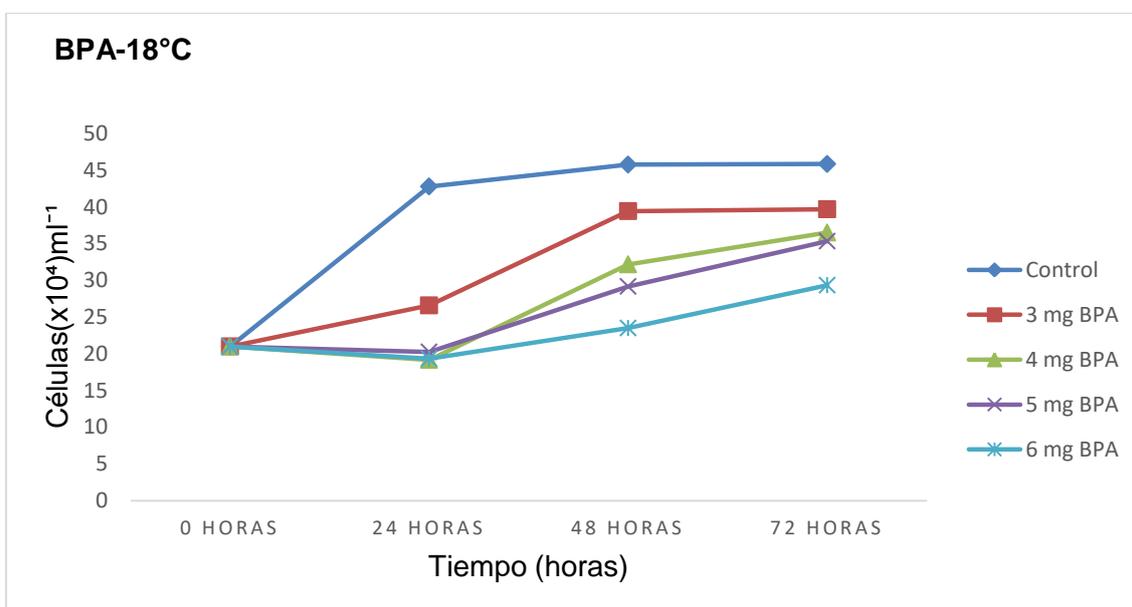


Figura 3. Curvas del crecimiento celular de *Tetraselmis suecica* a 18°C en presencia de distintas concentraciones de bisfenol-A (mg l^{-1}). Los valores representados se corresponden a la media de las tres réplicas \pm la desviación estándar.

Tabla 1. Medias y desviaciones típicas del crecimiento celular de *Tetraselmis suecica* en el control y en las distintas concentraciones de bisfenol-A a las 72h de exposición expresadas en días⁻¹.

A 18°C	μ72	SD	A 22°C	μ72	SD
Control	0,559	0,058	Control	0,522	0,008
3	0,454	0,013	3	0,112	0,096
4	0,305	0,060	4	0,084	0,059
5	0,236	0,005	5	0,007	0,030
6	0,0798	0,042	6	-0,022	0,061

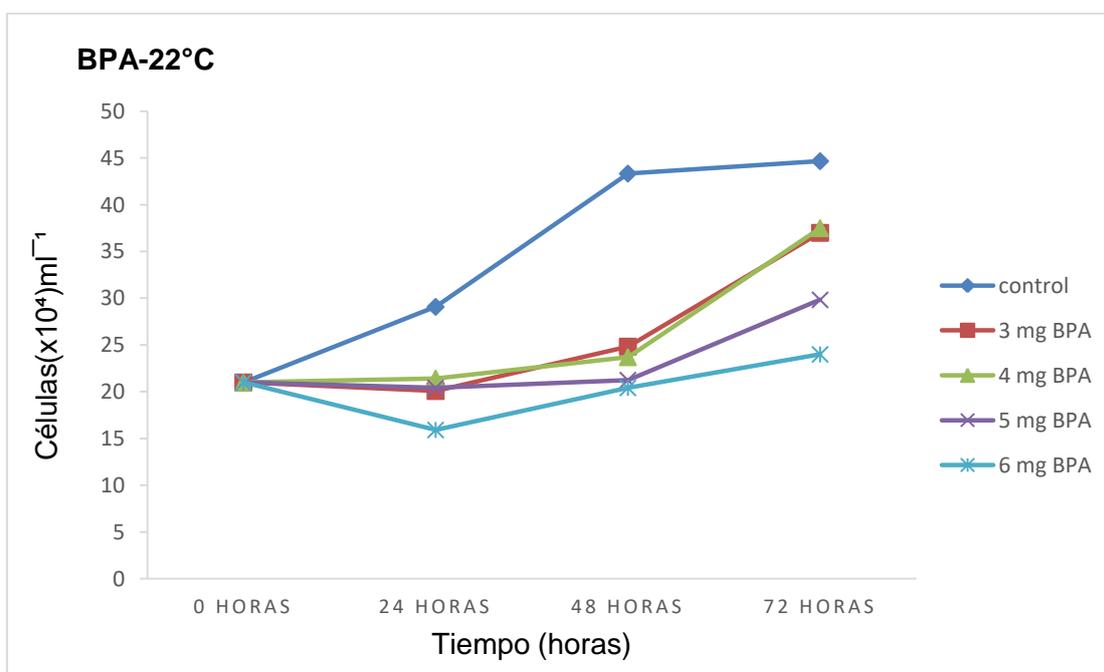


Figura 4. Curvas del crecimiento celular de *Tetraselmis suecica* a 22°C en presencia de distintas concentraciones de bisfenol-A (mg l⁻¹). Los valores representados se corresponden a la media de las tres réplicas ± la desviación estándar.

Un incremento de temperatura de cultivo, hasta los 22°C, tiene una densidad celular media del control a las 24h de 29,08 células/ml mientras que la densidad media de los expuestos al contaminante a máxima concentración es de 15,92 células/ml, por lo que también se reduce la mitad con respecto al control. Este incremento de temperatura también induce un mayor efecto negativo sobre el crecimiento de los cultivos expuestos a BP-A (Fig. 4).

El efecto inhibitor del crecimiento del BPA ya se había descrito anteriormente (Torres Maroño, 2015) para *Tetraselmis suecica* donde a medida que aumenta la concentración de BPA, disminuye la tasa de crecimiento celular.

En la tablas 1 se describen los parámetros del crecimiento celular a las 72h debido a que es donde se producen más diferencias con respecto al control. El crecimiento es menor cuando la temperatura es más alta, por lo tanto al igual que en las gráficas, esto corrobora que afecta negativamente en el crecimiento celular del alga *Tetraselmis suecica*. Aquí vemos una caída muy importante en la concentración de 5 mg de contaminante a 22°C con respecto a los 18°C.

La concentración efectiva media (EC50) calculada a las 72h, a los 18°C es de 11,09 mg l⁻¹, mientras que a los 22°C es de 6,89 mg l⁻¹. Lo cual podemos observar que el aumento de temperatura provoca una reducción de EC50, es decir, al aumentar la temperatura es necesaria una concentración menor de BPA para reducir el crecimiento de *T.suecica*, o lo que es lo mismo, un incremento de la temperatura lleva asociado un incremento en la toxicidad de este compuesto. En estudios similares como el de (Maroño, 2015) la EC50 fue de 2,73 mg l⁻¹, mucho menor que nuestro resultado, o en el de (Ebenezer & Ki, 2013) resultó la EC50 para *Tetraselmis suecica* con diferentes concentraciones de metales pesados: EC50 (Cu)=43,03 mg l⁻¹, EC50 (Ni)=16,11 mg l⁻¹, EC50 (Pb)= 9,62 mg l⁻¹ ;y para diferentes disruptores endocrinos: EC50 (BPA)=15,55 mg l⁻¹ , EC50 (endosulfán)=0,045 mg l⁻¹ y EC50 (bifenilo policlorado)=3,96 mg l⁻¹.

En otro estudio se observa una EC50 para *Tetraselmis suecica* con BPA de 15,55 mg l⁻¹ (Ebenezer & Ki, 2016). También se realiza el cálculo de la EC50 de *Tetraselmis suecica* con otro tóxico Aroclor 1016 el cual es de 3,9 mg l⁻¹. En estos ensayos también se realiza la EC₅₀ de BPA para diferentes especies de microalgas, como son la diatomácea *Ditylum brightwelli* con un EC₅₀ de 0,03 mg l⁻¹ y el dinoflagelado *Prorocentrum minimum* con un EC₅₀ de 1,5 mg l⁻¹.

También existen otros estudios donde se encuentra que la microalga *Nannochloropsis gaditana* presenta un EC₅₀= 2,30 mg l⁻¹ (Pardo, 2015), *Navicula incerta* con un EC₅₀= 3,73 mg l⁻¹ a las 96h (Liu *et al.*,2010) o *Stephanodiscus hantzschii* de EC₅₀= 8,65 mg l⁻¹ (Li *et al.*, 2009).

Por lo tanto se puede deducir que Aroclor 1016 al igual que el endosulfán, el bifenilo policlorado y el plomo en menor medida son mucho más tóxicos que el BPA, del mismo modo que el BPA es más tóxico que el cobre y el níquel. Por otro lado,

T.suecica es más tolerante al BPA que *Ditylum brightwelli*, *Prorocentrum minimum*, *Nannochloropsis gaditana*, *Navicula incerta* y *Stephanodiscus hantzschii*.

En comparación con el estudio de (Seoane *et al.*, 2014) se observa el efecto tóxico de los fármacos como son el cloranfenicol (CLO), oxitetraciclina (OTC) y florfenicol (FLO) donde *Tetraselmis suecica* se ve afectada significativamente por la presencia de estos antibióticos al igual que con el bisfenol-A.

Al exponer muchas de estas especies de microalgas a la presencia de BPA en períodos de tiempo corto, le provoca un efecto perjudicial agudo, sin embargo si se exponen a períodos largos de tiempo, las microalgas pueden adaptarse a esas condiciones y no mostrar cambios tan evidentes (Zhang *et al.*, 2012).

DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS

Los marcadores bioquímicos, como los pigmentos, son frecuentemente utilizados para la monitorización de la contaminación en ambientes acuáticos (Ares González, 2016). Los distintos metabolitos que contienen las células son productos finales de procesos de regulación en respuesta a cambios ambientales producidos en ambientes acuáticos (Jamers *et al.*, 2009) como podría ser el efecto de un contaminante en este caso.

El contenido en clorofilas *a* y *b* se ha descrito como el índice ideal para evaluar el efecto de los contaminantes sobre las microalgas en las tasas fotosintética y respiratoria (Xu *et al.*, 2013).

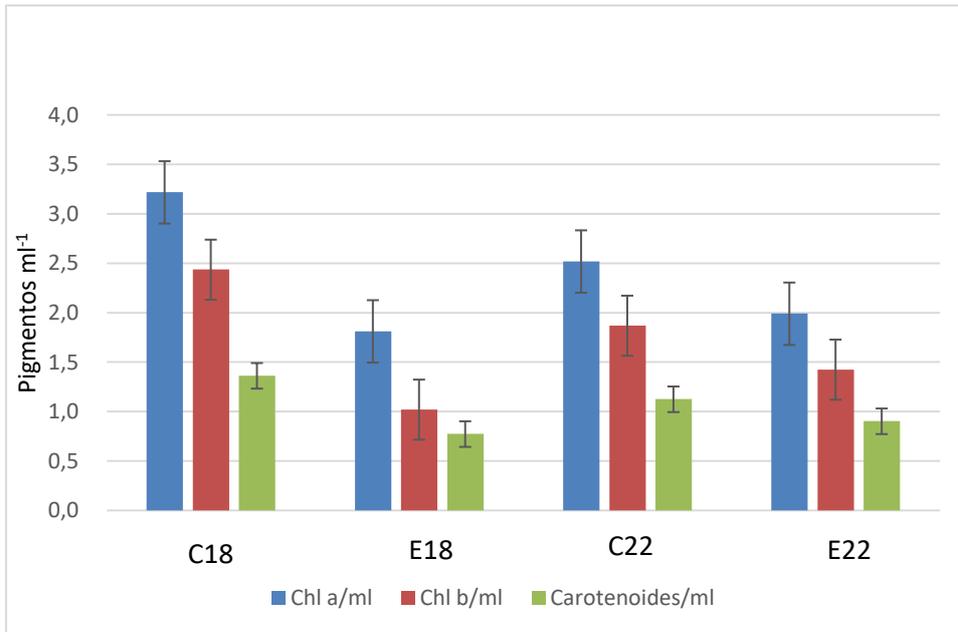


Figura 3. Contenido total de clorofila *a*, *b* y carotenoides respectivamente en pigmentos ml^{-1} a las 72h en el control a los 18°C (C18) y a los 22°C (C22), y el estresado con una concentración de 6mg de BPA ml^{-1} a los 18°C (E18) y a los 22°C (E22). Los valores representados se corresponden a la media de las tres réplicas \pm la desviación estándar.

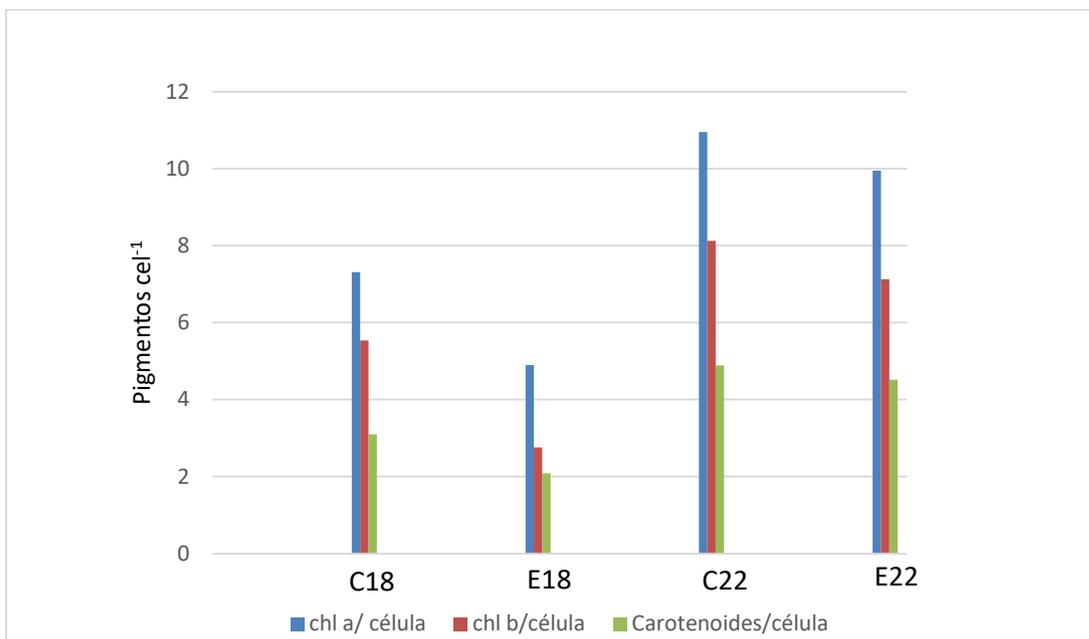


Figura 4. Contenido celular total de clorofila *a*, *b* y carotenoides respectivamente en pigmentos cel^{-1} a las 72h en el control a los 18°C (C18) y a los 22°C (C22), y el estresado con una concentración de 6mg de BPA ml^{-1} a los 18°C (E18) y a los 22°C (E22).

Tabla 2. Contenido de clorofilas y carotenos en los cultivos de *T. suecica* en cultivos control a 2 temperaturas (C18 y C22) y expuestos a 6mg/l de BP-A en las dos temperaturas (E18 y E22), a las 72h de cultivo.

A 72h	Chl <i>a</i> /ml	Chl <i>b</i> /ml	Car/ml	Chl <i>a</i> / célula	Chl <i>b</i> / célula	Car/célula
C18	3,218	2,436	1,362	7,314	5,537	3,097
E18	1,812	1,020	0,773	4,898	2,758	2,090
C22	2,519	1,869	1,125	10,952	8,128	4,892
E22	1,990	1,425	0,902	9,953	7,125	4,513

Podemos observar los contenidos de clorofilas y carotenos tanto por ml de cultivo como por célula. Los resultados en concentración de pigmentos ml^{-1} muestran que hay diferencias en los tres entre el control y el contaminado a 18°C, sin embargo en el de 22°C no se aprecia tanta diferencia entre ellos. Pero sin embargo, en las concentraciones celulares de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides se detecta un aumento significativo de estos elementos, esto quiere decir que el número de células es mucho menos en los contaminados que en el control. Además también se ve una diferencia entre los controles y los contaminados a 18°C y los que estaban a 22°C.

Por lo tanto la presencia de BPA afectó de forma significativa el contenido celular de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenos en *Tetraselmis suecica*. Además, el aumento de temperatura también es un factor negativo.

En el estudio de Torres Maroño (2015) se observa a las 72h que a medida que aumenta la concentración de BPA, disminuye la concentración de clorofila célula⁻¹. Otros estudios también señalan que un aumento en la concentración del BPA provocan una caída significativa en el contenido celular de los pigmentos (Li et al., 2009). A cantidades mayores de 5mg l⁻¹ de BPA, se estableció que la microalga sufre rupturas de la pared celular haciendo que los orgánulos pierdan su orden, estructura y color, ya que las células cambian su color verde-amarillo indicando que el cloroplasto se desintegra y por tanto las moléculas de clorofila también (Pardo, 2015).

CONCLUSIÓN

Los diferentes análisis realizados nos indican que el bisfenol A (BPA) es tóxico para la microalga marina *Tetraselmis suecica*. La exposición a diferentes concentraciones del contaminante BPA, provoca diferencias en el crecimiento celular de esta especie. Además, los pigmentos fotosintéticos (clorofila *a* y *b* y carotenoides) también se ven alterados.

Otro factor importante que afecta de manera directa en la toxicidad del BPA en *T.suecica* es la temperatura. Un pequeño aumento de la temperatura provoca que los daños tóxicos por BPA sean mayores.

A la vista de los resultados, se puede decir que la especie en estudio sería un buen bioindicador de la calidad en los ambientes marinos debido a su sensibilidad a este contaminante emergente

Deberían hacerse otras investigaciones para ver cómo influye la temperatura en *T.suecica* gradualmente en el tiempo, o obtener más datos ya que los estudiados no son suficientes para hacer un análisis estadístico concluyente.

CONCLUSIÓN

Os diferentes análisis realizados indicannos que o bisfenol A (BPA) é tóxico para a microalga mariña *Tetraselmis suecica*. A exposición a diferentes concentracións do contaminante BPA, provoca diferencias no crecemento celular desta especie. Ademáis, os pigmentos fotosintéticos (clorofila *a* y *b* y carotenoides) tamén se ven alterados.

Outro factor importante que afecta de maneira directa na toxicidade do BPA en *T.suecica* é a temperatura. Un pequeno aumento da temperatura provoca que os danos tóxicos por BPA sean maiores.

A vista dos resultados, pódese decir que a especie en estudio sería un bo bioindicador de calidade nos ambientes mariños debido a súa sensibilidade a este contaminante emerxente.

Deberían facerse outras investigacións para ver como influe a temperatura en *T.suecica* gradualmente no tempo, ou obter máis datos xa que os estudados non son suficientes para facer un análisis estadístico concluínte.

CONCLUSION

The different analyses carried out indicate that bisphenol A (BPA) is toxic to the marine microalgae *Tetraselmis suecica*. Exposure to different concentrations of the BPA contaminant causes differences in cell growth of these species. In addition, photosynthetic pigments (chlorophyll *a* and *b* and carotenoids) are also altered.

Another important factor that directly affects the toxicity of BPA in *T. suecica* is the temperature. A small increase in temperature causes toxic damage to BPA to become bigger.

In view of the results, we can say that the species under study would be a good bioindicator of quality in marine environments due to their sensitivity to this emerging pollutant

Other researches should be done to see how temperature influences in *T. suecica* gradually over time, or to obtain more data since the studied are not enough to make a conclusive statistical analysis.

BIBLIOGRAFÍA

- Ares González, A. (2016). *Estudio de los efectos tóxicos del plomo sobre la microalga marina Tetraselmis suecica* (trabajo de fin de grado). Recuperado de <http://hdl.handle.net/2183/17319>
- Cid, A., Abalde, J., & Herrero, C. (1992). Crecimiento y composición bioquímica de la microalga marina *Tetraselmis suecica* en cultivos mixotróficos con distintos azúcares y aminoácidos. *Cahiers de Biologie Marine*, 33(2), 169–178. Recuperado de <http://hdl.handle.net/2183/13847>
- Damià Barceló, L., & López de Alda, M. J. (2007). *Contaminación y calidad química del agua: El problema de los contaminantes emergentes*. Recuperado de <https://fnca.eu/39-investigacion/investigacion/126-politica-del-agua>
- Díaz-Gómez, N. M., Ares, S., Hernández-Aguilar, M. T., Ortega-García, J. A., Paricio-Talayero, J. M., Landa-Rivera, L., & Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría. (2013). Contaminantes químicos y lactancia materna: Tomando posiciones. *Anales de Pediatría*, 79(6), 391.e1–391.e5. doi:10.1016/j.anpedi.2013.04.004
- Ebenezer, V., & Ki, J. S. (2013). Quantification of the sub-lethal toxicity of metals and endocrine-disrupting chemicals to the marine green microalga *Tetraselmis suecica*. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 16(3), 187–194. doi:10.5657/FAS.2013.0187
- Ebenezer, V., & Ki, J. S. (2016). Toxic effects of Aroclor 1016 and bisphenol A on marine green algae *Tetraselmis suecica*, diatom *Ditylum brightwellii* and dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Korean Journal of Microbiology*, 52(3), 306–312. doi:10.7845/KJM.2016.6050
- Fabregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B., & Veiga, M. (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, 42(3–4), 207–215. doi:10.1016/0044-8486(84)90101-7
- Farías, A., & Uriarte, I. (2002). Nutrición en larvicultura de pectínidos: Relevancia de proteínas y lípidos. En: L. E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. G. Gaxiola-Cortés, & N. Simoes (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola* (pp. 309–313). Recuperado de http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/VI
- García Gutiérrez, M. (2018). *Acumulación y transferencia de contaminantes emergentes en una cadena trófica* (trabajo de fin de máster). Recuperado de <http://hdl.handle.net/2183/20328>

- Jamers, A., Blust, R., & De Coen, W. (2009). Omics in algae: Paving the way for a systems biological understanding of algal stress phenomena? *Aquatic Toxicology*, 92(3), 114–121. doi:10.1016/j.aquatox.2009.02.012
- Jeffrey, S. W., & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 167(2), 191–194. doi:10.1016/S0015-3796(17)30778-3
- Juan-García, A., Gallego, C., & Font, G. (2015). Toxicidad del bisfenol A: Revisión. *Revista de Toxicología*, 32(2), 144–160. Recuperado de <http://rev.aetox.es/wp/index.php/32-2-13>
- Li, R., Chen, G. Z., Tam, N. F. Y., Luan, T. G., Shin, P. K. S., Cheung, S. G., & Liu, Y. (2009). Toxicity of bisphenol A and its bioaccumulation and removal by a marine microalga *Stephanodiscus hantzschii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2), 321–328. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.05.012
- Liu, Y., Guan, Y., Gao, Q., Tam, N. F. Y., & Zhu, W. (2010). Cellular responses, biodegradation and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in marine diatom *Navicula incerta*. *Chemosphere*, 80(5), 592–599. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.03.042
- Mora, R., Moronta, R., Ortega, J., & Morales, E. (2004). Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella* sp. aislada de la Represa de Tulé, Municipio Mara, Estado Zulia, Venezuela. *Ciencia (Maracaibo)*, 12(2), 117–124. Recuperado de <http://www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php/ciencia/article/view/9214>
- Olea, N. (2001). La exposición a disruptores endocrinos. Ponencia del Curso de Verano de El Escorial Riesgo Tóxico: Protección Ambiental, Salud Laboral y Seguridad Alimentaria de la Universidad Complutense de Madrid. Recuperado de <http://www.istas.net/descargas/escorial/ponen/ponen11.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (2009). *BISFENOL A (BPA) – Estado actual de los conocimientos y medidas futuras de la OMS y la FAO* (Nota informativa de INFOSAN No. 5/2009). Recuperado de http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_05_Bisphenol_A_Nov09_sp.pdf
- Ortega García, J. A., Ferrís i Tortajada, J., Molini Menchón, N., López Andreu, J. A., García i Castell, J., Cánovas Conesea, C. A., ... Andreu Alapont, E. (2002). Hospital sostenible (parte I). Exposición pediátrica a cloruro de polivinilo y ftalatos. Medidas preventivas. *Revista Española de Pediatría*, 58(4), 251–266.
- Pardo Castillo, M. C. (2015). *Efecto tóxico del contaminante acuático bisfenol A sobre la microalga marina Nannochloropsis gaditana* (trabajo de fin de máster inédito). Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.

- Pérez Abejón, C. (2012). *Toxicología del envasado y del procesado de alimentos: El bisfenol A y la acrilamida*.
- Richter, C. A., Birnbaum, L. S., Farabollini, F., Newbold, R. R., Rubin, B. S., Talsness, C. E., ... vom Saal, F. S. (2007). In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 199–224. doi:10.1016/j.reprotox.2007.06.004
- Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., & Cid, A. (2014). Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. *Marine Environmental Research*, 101(1), 1–7. doi:10.1016/j.marenvres.2014.07.011
- Silva, J., Vázquez, V., & Merino, F. (2011). Producción de biomasa de *Tetraselmis suecica* empleando agua de mar con sanguaza. *Scientia Agropecuaria*, 2(1), 13–23. doi:10.17268/sci.agropecu.2011.01.02
- Torres Maroño, S. (2015). *Efecto del bisfenol A, un microcontaminante acuático emergente, sobre la microalga marina Tetraselmis suecica* (trabajo de fin de grado). Recuperado de <http://hdl.handle.net/2183/14841>
- Van Wezel, A. P., & van Vlaardingen, P. (2004). Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquatic Toxicology*, 66(4), 427–444. doi:10.1016/j.aquatox.2003.11.003
- Xu, D., Li, C., Chen, H., & Shao, B. (2013). Cellular response of freshwater green algae to perfluorooctanoic acid toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 88, 103–107. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.10.027
- Zhang, W., Xiong, B., Sun, W. F., An, S., Lin, K. F., Guo, M. J., & Cui, X. H. (2012). Acute and chronic toxic effects of bisphenol a on *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Toxicology*, 29(6), 714–722. doi:10.1002/tox.21806