



UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

Área de Microbiología

**Estudio del efecto citotóxico ejercido por el diclofenaco sobre las microalgas
Chlamydomonas reinhardtii y *Phaeodactylum tricornutum***

**Estudo do efecto citotóxico exercido polo diclofenaco sobre as microalgas
Chlamydomonas reinhardtii y *Phaeodactylum tricornutum***

**Study of the cytotoxic effect caused by diclofenac on the microalgae
Chlamydomonas reinhardtii and *Phaeodactylum tricornutum***

Sara Martínez Dopico

Febrero, 2018

Máster en Biotecnología Avanzada



UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

Área de Microbiología

Estudio del efecto citotóxico ejercido por el diclofenaco sobre las microalgas

Chlamydomonas reinhardtii y *Phaeodactylum tricornutum*

Estudo do efecto citotóxico exercido polo diclofenaco sobre as microalgas

Chlamydomonas reinhardtii y *Phaeodactylum tricornutum*

Study of the cytotoxic effect caused by diclofenac on the microalgae

Chlamydomonas reinhardtii and *Phaeodactylum tricornutum*

Autora:

SARA MARTÍNEZ DOPICO

Dña. **María Ángeles Cid Blanco**, Catedrática de Universidad del Área de Microbiología del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña, en calidad de tutora de este trabajo, autoriza su presentación y defensa ante el Tribunal Evaluador.

Fdo.: Dña. María Ángeles Cid Blanco

CID BLANCO
MARIA
ANGELES -
32766713Q

Firmado digitalmente por CID
BLANCO MARIA ANGELES -
32766713Q
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES, serialNumber=32766713Q,
sn=CID BLANCO,
givenName=MARIA ANGELES,
cn=CID BLANCO MARIA ANGELES
- 32766713Q
Fecha: 2019.02.04 10:04:15
+01'00'

A CORUÑA, 4 DE FEBRERO DE 2019

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVO.....	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
3.1. Descripción de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Dangeard.....	6
3.2. Condiciones de cultivo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	6
3.3. Descripción de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> Bohlin.....	7
3.4. Condiciones de cultivo de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	8
3.5. Diseño experimental.....	8
3.6. Determinación espectrofotométrica de pigmentos fotosintéticos.....	9
3.7. Determinación del rendimiento o eficiencia fotosintética.....	10
3.8. Análisis por citometría de flujo.....	10
3.8.1. Determinación de la densidad celular.....	11
3.8.2. Determinación de las propiedades inherentes celulares.....	11
3.8.3. Determinación de la viabilidad celular.....	12
Ioduro de propidio.....	12
Diacetato de fluoresceína.....	13
3.8.4. Análisis <i>in fluxo</i> de la actividad esterasa inespecífica a tiempo real.....	13
3.8.5. Determinación del pH intracelular.....	14
3.8.6. Determinación del potencial de membrana citoplasmática.....	15
3.8.7. Análisis del estrés oxidativo.....	15
3.9. Análisis estadístico.....	16
4. RESULTADOS.....	17

4.1. Crecimiento.....	17
4.2. Pigmentos fotosintéticos	18
4.3. Eficiencia fotosintética	19
4.4. Propiedades inherentes.....	19
4.5. Viabilidad celular.....	20
Ioduro de propidio.....	20
Diacetato de fluoresceína	21
4.6. Actividad metabólica	21
4.7. pH intracelular	23
4.8. Potencial de membrana citoplasmática.....	23
4.9. Estrés oxidativo: producción de peróxido de hidrógeno.....	24
5. DISCUSIÓN.....	25
6. CONCLUSIONES.....	32
7. BIBLIOGRAFÍA.....	33
ANEXO I. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	36

ABREVIATURAS

AINE	Anti-inflamatorio no esteroideo
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , Análisis de la varianza de una vía
BCECF AM	<i>2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester</i> , 2',7'-bis-(2-Carboxietil)-5-(6)-carboxifluoresceína acetometil éster
CCAP	<i>Culture Collection of Algae and Protozoa</i> , Colección de Cultivos de Algas y Protozoos
COX	Ciclooxigenasas
DiBAC₄(3)	<i>Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol</i> , Bis-(1,3-ácido dibutilbarbitúrico) trimetino oxonol
DHR 123	<i>Dihydrorhodamine 123</i> , Dihidrorrodamina 123
DF	Diclofenaco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
EC₅₀	<i>Half maximal Effective Concentration</i> , Concentración efectiva media
IP	Ioduro de Propidio
FCM	<i>Flow Cytometry</i> , Citometría de flujo
FDA	<i>Flurescein Diacetate</i> , Diacetato de fluoresceína
FS	<i>Forward Scatter light</i> , Luz refractada hacia delante
PAM	<i>Pulse Amplitude Modulation</i> , Modulación por amplitud de pulso
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Tampón fosfato salino
PPCPs	<i>Pharmaceuticals and Personal Care Products</i> , Fármacos y productos de higiene personal
PSII	<i>Photosystem II</i> , Fotosistema II,
QY	<i>Quantum Yield</i> , Rendimiento fotosintético
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , Especies reactivas de oxígeno
SS	<i>Side Scatter light</i> , Luz refractada lateralmente

TAP	<i>Tris-Acetate-Phosphate</i> , Tris Acetato Fosfato
T.C.	Tasa de Crecimiento
u.a.	Unidades arbitrarias

RESUMEN

Los contaminantes emergentes, entre los que se encuentran los fármacos y productos de higiene personal, representan una amenaza para los ecosistemas acuáticos y, en particular, para la comunidad microalgal, de quien depende la mayor parte de la producción primaria de estos ambientes. El anti-inflamatorio no esteroideo diclofenaco es uno de los medicamentos más consumido y con mayor presencia en las aguas de todo el mundo; sin embargo, no se conoce mucho acerca de su potencial ecotoxicidad. En este trabajo se estudió el potencial efecto citotóxico del diclofenaco sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii* y la diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum*. Los cultivos microalgales se expusieron a concentraciones de 50, 100, 125 y 150 mg L⁻¹ de diclofenaco durante 24 y 96 h. Múltiples biomarcadores de citotoxicidad fueron analizados: crecimiento, contenido de pigmentos fotosintéticos, eficiencia fotosintética, propiedades inherentes, viabilidad celular, actividad metabólica, pH intracelular, potencial de membrana citoplasmática y estrés oxidativo. Los resultados mostraron que el diclofenaco es tóxico para las dos especies ensayadas. La más sensible fue *P. tricornutum*, cuyo crecimiento se vio completamente inhibido a las concentraciones más altas. La eficiencia fotosintética, la complejidad celular, la autofluorescencia, el pH intracelular y el potencial de membrana citoplasmática también se vieron significativamente afectados; sin embargo, para *C. reinhardtii*, sólo la actividad metabólica y la eficiencia fotosintética resultaron ser sensibles. El único parámetro que se ha visto significativamente afectado en ambas especies fue la eficiencia fotosintética. La viabilidad celular, el contenido de pigmentos fotosintéticos y el estrés oxidativo no se vieron afectados significativamente en ninguna de las dos especies.

Palabras clave: diclofenaco, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricornutum*, microalgas, citometría de flujo, citotoxicidad.

RESUMO

Os contaminantes emerxentes, entre os que se atopan os fármacos e produtos de hixiene persoal, representan unha ameaza para os ecosistemas acuáticos e, en particular, para a comunidade microalgal, de quen depende a maior parte da produción primaria destes ambientes. O anti-inflamatorio non esteroideo diclofenaco é un dos medicamentos máis consumidos e con maior presenza nas augas de todo o mundo; porén, non se coñece moito acerca da súa potencial ecotoxicidade. Neste traballo, estudouse o potencial efecto citotóxico do diclofenaco sobre a microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii* e a diatomea mariña *Phaeodactylum tricornutum*. Os cultivos de microalgas expuxéronse a concentracións de 50, 100, 125 e 150 mg L⁻¹ de diclofenaco durante 24 e 96 h. Múltiples biomarcadores de citotoxicidade foron analizados: crecemento, contido de pigmentos fotosintéticos, eficiencia fotosintética, propiedades inherentes, viabilidade celular, actividade metabólica, pH intracelular, potencial membrana citoplasmática e estrés oxidativo. Os resultados mostraron que o diclofenaco é tóxico para as dúas especies ensaiadas. A máis sensible foi *P. tricornutum* cuxo crecemento se viu completamente inhibido ás concentracións máis altas. A eficiencia fotosintética, a complexidade celular, a autofluorescencia, o pH intracelular e o potencial de membrana citoplasmática tamén se viron significativamente afectados; porén, para *C. reinhardtii*, só a actividade metabólica e a eficiencia fotosintética resultaron ser sensibles. O único parámetro que se viu afectado significativamente en ambas especies foi a eficiencia fotosintética. A viabilidade celular, o contido de pigmentos fotosintéticos e o estrés oxidativo non se viron significativamente afectados en ningunha das dúas especies.

Palabras clave: diclofenaco, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricornutum*, microalgas, citometría de fluxo, citotoxicidade.

ABSTRACT

Emerging contaminants, including pharmaceuticals and personal care products, represent a threat to aquatic ecosystems and, in particular, to the microalgal community, on which most of the primary production of these environments depends. The non-steroidal anti-inflammatory diclofenac is one of the most consumed and most prevalent drug in world's waters; however, not much is known about its ecotoxicity potential. In this work the potential cytotoxic effect of diclofenac on the freshwater microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* was studied. Microalgal cultures were exposed to concentrations of 50, 100, 125 and 150 mg L⁻¹ of diclofenac for 24 and 96 h. Multiple biomarkers of cytotoxicity were analyzed: growth, photosynthetic pigment content, photosynthetic efficiency, inherent properties, cell viability, metabolic activity, intracellular pH, cytoplasmic membrane potential and oxidative stress. Results showed that diclofenac is toxic to both species assayed. The most sensitive species was *P. tricorutum*, whose growth was completely inhibited at the highest concentrations. Photosynthetic efficiency, cellular complexity, autofluorescence, intracellular pH and cytoplasmic membrane potential were also significantly affected; however, for *C. reinhardtii*, only metabolic activity and photosynthetic efficiency were found to be sensitive. The only parameter significantly affected in both species was photosynthetic efficiency. Cell viability, photosynthetic pigment content and oxidative stress were not significantly affected in either species.

Keywords: diclofenac, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricorutum*, microalgae, flow cytometry, cytotoxicity

1. INTRODUCCIÓN

La actividad antropogénica provoca la liberación al ecosistema de multitud de agentes químicos procedentes de la industria, las tareas agrícolas y los núcleos urbanos. En concreto, los ambientes acuáticos, incluyendo agua dulce, estuarios y aguas costeras marinas, se contaminan a menudo con numerosos compuestos orgánicos e inorgánicos que pueden ejercer un efecto directo sobre diferentes procesos fisiológicos, biológicos y poblacionales de los organismos que los habitan y, por tanto, alterar la estructura de las comunidades biológicas.

Hasta principios de los 90, las investigaciones relacionadas con la calidad del agua se habían centrado, principalmente, en los contaminantes prioritarios, cuya presencia en el medio ambiente ha estado o está regulada por la legislación. Sin embargo, en los últimos años, el desarrollo de nuevas técnicas analíticas más sensibles, ha revelado la presencia de multitud de contaminantes de diversas fuentes, denominados **contaminantes emergentes** (Petrović *et al.*, 2003; Rodríguez-Narváez *et al.*, 2017; Seoane, 2018). La **Directiva 2013/39/UE**, por la que se establecen las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, los define como contaminantes que en la actualidad no están incluidos en los programas de seguimiento sistemático en la Unión Europea, 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.

La lista de los contaminantes emergentes incluye una amplia variedad de productos de diferente origen y naturaleza química. Algunos de los más relevantes son: fármacos, productos de cuidado e higiene personal, pesticidas, biocidas, hormonas, etc. (Rodríguez-Narváez *et al.*, 2017). Aunque generalmente se encuentran a bajas concentraciones, en el rango de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$, su gran demanda y consumo junto con la aparición de nuevos productos y la incapacidad de las depuradoras para su completa eliminación, hace que estos contaminantes sean continuamente introducidos en el medio ambiente y no necesiten ser persistentes para provocar efectos negativos (Petrović *et al.*, 2003).

Hasta la fecha, solo los contaminantes prioritarios están regulados por la legislación (**Directiva 2008/105/CE**). Sin embargo, hace relativamente poco tiempo, la **Comisión Europea** ha empezado a tener en cuenta algunos productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs, *Pharmaceuticals and personal care products*), como futuros candidatos

con prioridad emergente, por lo que se espera que la legislación amplíe la lista para abarcar también los contaminantes emergentes (Ebele *et al.*, 2017).

Los PPCPs son un grupo único de contaminantes emergentes que en los últimos años han generado una creciente preocupación debido a su presencia no intencionada en diferentes compartimentos del medio acuático y a concentraciones capaces de causar efectos perjudiciales sobre los organismos que habitan en él (Ebele *et al.*, 2017). **De todos los contaminantes emergentes, los fármacos son los que mayor preocupación y estudio han suscitado en los últimos años**, ya que se han encontrado residuos de estos compuestos incluso en el agua potable (Rodríguez-Narváez *et al.*, 2017; Seoane, 2018). La principal preocupación acerca de las implicaciones tóxicas de los productos farmacéuticos es que están diseñados específicamente para maximizar su actividad biológica a dosis bajas y para atacar ciertos mecanismos metabólicos, enzimáticos o de señalización celular, lo cual aumenta potencialmente la posibilidad de que sean farmacológicamente activos en organismos no diana (Ebele *et al.*, 2017; He *et al.*, 2017). La gran diversidad de fármacos existentes, la aparición de otros nuevos y su uso a gran escala, contribuye sustancialmente a la presencia ambiental de estos químicos y sus metabolitos activos en el agua. Por lo tanto, es necesario conocer la potencial ecotoxicidad de estos compuestos, ya que solo una pequeña parte de ellos se han investigado en estudios ambientales (Ebele *et al.*, 2017; Rodríguez-Narváez *et al.*, 2017; Majewska *et al.*, 2018).

De todos los fármacos existentes, los más ampliamente utilizados a nivel mundial son los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), un grupo heterogéneo de más de 50 medicamentos diferentes, que se utilizan para el tratamiento de inflamación, dolor y fiebre. A pesar de que presentan diferencias sustanciales en su estructura química, presentan un mecanismo de acción común que consiste en la inhibición de las ciclooxigenasas (COX), enzimas encargadas de la síntesis de prostaglandinas, responsables de la generación de dolor e inflamaciones (Lanas, 2016; He *et al.*, 2017; Sharma & Kaushik, 2017). Los residuos de estos AINEs se han detectado en una gran diversidad de ambientes acuáticos e incluso en el agua potable. Su principal fuente son los excrementos de humanos y animales, pero también son importantes los efluentes y derrames de las fábricas, la eliminación directa por parte de hogares y hospitales y la filtración de los tanques de aguas residuales (Sharma & Kaushik, 2017).

El diclofenaco (DF) o ácido 2-(2,6-diclorofenil) amino-fenil-acético (**Fig. 1**) es uno de los AINEs más recetados. Su alta tasa de consumo, junto a su baja degradación por parte de las plantas de tratamiento de aguas, hace que sea frecuentemente detectado en ríos, sedimentos, lodos y agua potable (Lonappan *et al.*, 2016; He *et al.*, 2017). De hecho, varios

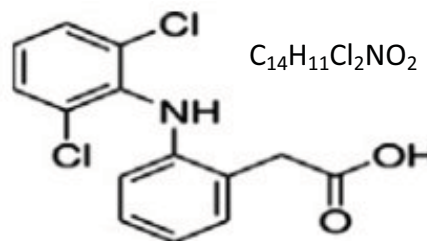


Figura 1. Estructura y fórmula molecular del diclofenaco (en su forma ionizada) (Lonappan *et al.*, 2016).

estudios han demostrado que **se trata del fármaco mayormente detectado en el medio ambiente** (aus der Beek *et al.*, 2016; He *et al.*, 2017; Ebele *et al.*, 2017; Bonnefille *et al.*, 2018). Además, de **entre todos los AINEs, el DF es uno de los que contiene el mayor nivel de toxicidad aguda** (Cleuvers, 2003; Sharma & Kaushik, 2017) **en diferentes niveles de la cadena trófica** (He *et al.*, 2017). Es por ello que, desde principios de la década de los 2000, los efectos ambientales del DF se han convertido en una preocupación creciente. Sin embargo, hasta ahora, se han realizado pocos estudios para determinar su alcance y su efecto en los ecosistemas marinos, por lo que existe una necesidad de investigación en este contexto (Lonappan *et al.*, 2016; Bonnefille *et al.*, 2018).

En general, todos los contaminantes provocan cambios en la estructura del ecosistema, afectando a las comunidades bióticas. Los primeros afectados por las descargas de diferentes contaminantes en el ecosistema son, generalmente, los microorganismos, ya que están en contacto directo con el medio, separados simplemente por una membrana o pared celular (Franqueira *et al.*, 2000). En concreto, las microalgas, debido a sus cortos tiempos de generación, responden rápidamente a los cambios ambientales y, dado que son los principales productores primarios acuáticos, cualquier efecto sobre ellas, puede resultar en graves repercusiones en niveles tróficos más altos (Campanella *et al.*, 2001; Cid *et al.*, 2012). **Hoy en día, las microalgas se consideran indicadores útiles de la calidad ambiental** por diversas razones: son habitantes ubicuos de todas las masas de agua; son miembros representativos del fitoplancton; en general son de pequeño tamaño y fácilmente cultivables en el laboratorio; son sensibles a un amplio grupo de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, etc. Por todo ello, **son habitualmente utilizadas en bioensayos de toxicidad en el laboratorio** (Franqueira *et al.*, 2000; Cid *et al.*, 2012; Seoane, 2018).

La mayor parte de los ensayos de toxicidad con microalgas realizados en laboratorio se han realizado con microalgas dulceacuícolas. En este sentido, la microalga verde de agua dulce *Chlamydomonas reinhardtii* ha ganado importancia en la investigación ecotoxicológica, principalmente porque es sensible a diferentes contaminantes, se encuentra comúnmente en el agua dulce y en los suelos, tiene un tiempo de generación corto, es fácil de cultivar y su genoma está secuenciado (Esperanza *et al.*, 2015). En el caso del medio marino, las algas verdes y diatomeas son las más utilizadas y, en concreto, la diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum*, ha sido propuesta por algunos autores como organismo estándar para ensayos de toxicidad con agua de mar (Torres *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2008). Es conocida por ser un microorganismo modelo en numerosas aplicaciones científicas, debido, principalmente, a que su genoma está secuenciado y a su facilidad de cultivo (Listwan *et al.*, 2018).

La respuesta de las microalgas a los contaminantes se mide, generalmente, utilizando parámetros basados en la población, como el crecimiento microalgal. Estos parámetros convencionales son muy relevantes desde el punto de vista ecológico, pero no tienen en cuenta la respuesta que se produce a nivel celular (Prado *et al.*, 2009; Esperanza *et al.*, 2015; Esperanza, 2017). En este sentido, estudios previos sobre el efecto de diferentes contaminantes sobre microalgas, demostraron que **los análisis por citometría de flujo son una alternativa a los parámetros analizados tradicionalmente y basados en la población** (Franqueira *et al.*, 2000; Franklin *et al.*, 2001; Prado *et al.*, 2009; Prado *et al.*, 2015; Esperanza *et al.*, 2015; Seoane *et al.*, 2017b), ya que permite la medida rápida, cuantitativa y simultánea de múltiples respuestas al estrés tóxico a nivel de una sola célula, como efectos morfológicos, bioquímicos y/o fisiológicos, en condiciones cercanas al estado *in vivo* (Shapiro, 1995; Franklin *et al.*, 2001; Esperanza *et al.*, 2016; Seoane *et al.*, 2017b).

Por otro lado, dado que las microalgas son microorganismos fotosintéticos oxigénicos y son responsables de la mayor parte de la producción total de oxígeno en los sistemas acuáticos, el estudio del efecto tóxico sobre la actividad fotosintética es especialmente relevante. El estado fotosintético puede medirse cuantificando el contenido de pigmento, pero las mediciones de fluorescencia también se han propuesto como métodos simples, rápidos y sensibles para detectar los efectos fotoinhibitorios de los factores de estrés ambientales en el fitoplancton (Esperanza *et al.*, 2016).

2. OBJETIVO

A la vista de lo expuesto anteriormente, se plantea como objetivo general de este trabajo evaluar y comparar el potencial efecto citotóxico de un medicamento de uso común y que aparece como contaminante de sistemas acuáticos, el anti-inflamatorio no esteroideo diclofenaco, sobre dos especies de microalgas; la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii* y la diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum*.

Este objetivo general se abordará a través del análisis del efecto de distintas concentraciones de diclofenaco sobre los siguientes parámetros o marcadores de citotoxicidad: crecimiento celular, contenido en pigmentos fotosintéticos, eficiencia fotosintética, propiedades inherentes, viabilidad celular, actividad metabólica, pH intracelular, potencial de membrana citoplasmática y estrés oxidativo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Descripción de *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard

La cepa utilizada en este estudio de *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard, fue la CCAP 11/32a mt⁺, que procede de la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos del Laboratorio Marino de Dunstaffnage (Escocia, Reino Unido).

El género *Chlamydomonas* se incluye en la división Chlorophyta, y dentro de esta se encuadra en la clase Chlorophyceae, orden Volvocales y familia Chlamydomonadaceae, según la clasificación de Bold (Bold y Wynne, 1985). Es un género muy amplio y con gran distribución, ya que se han encontrado en una gran diversidad de hábitats (Harris, 2009).

En concreto, la especie *C. reinhardtii* (Fig. 2) es una de las más conocidas y se ha convertido, desde la década de los 60, en una de las especies más extensamente utilizadas en el laboratorio. Es una microalga dulceacuícola unicelular de 10 µm de diámetro, de forma elipsoide y móvil por flagelos (Harris, 2009; Jeanneret *et al.*, 2016).



Figura 2. Micrografía de *Chlamydomonas reinhardtii*. Escala horizontal = 5 µm. Tomada de www.protisten.de (2011).

Las células vegetativas son haploides, y pueden reproducirse tanto sexual como asexualmente. En el caso de la reproducción sexual, se produce el apareamiento de dos tipos celulares opuestos: *mating type*⁺ y *mating type*⁻ determinados por un complejo locus genético (Harris, 2001; Jeanneret *et al.*, 2016). En este trabajo, para evitar la reproducción sexual, solo se han utilizado células de tipo mt⁺, de forma que no se pueda producir la fusión de los dos tipos celulares.

3.2. Condiciones de cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*

Los cultivos de *C. reinhardtii* se realizaron en medio TAP (*Tris-Acetate-Phosphate*) **inorgánico** (Gorman y Levine, 1965; Harris, 2009) con algunas modificaciones, como la ausencia de una fuente orgánica de carbono en el medio y la utilización de nitrato como fuente de nitrógeno (Esperanza, 2017). El medio se preparó en agua destilada, se ajustó a pH 7,0 con HCl al 37% y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Posteriormente se le añadió, en condiciones estériles, 3 mL L⁻¹ de una solución *stock* de

oligoelementos, la cual se preparó mediante la adición de 0,25 g de Algal (Nutrición Avanzada S.A.) en 50 mL de agua destilada, que posteriormente se esterilizó en autoclave y se almacenó a 4°C en oscuridad. La composición final del medio de cultivo se detalla en el **ANEXO I**.

Los cultivos *stock*, a partir de los cuales se toman los inóculos para llevar a cabo las distintas experiencias, se realizaron en matraces *Pyrex* de 500 mL en condiciones axénicas. Se mantuvieron sin aireación, en una cámara bajo condiciones lumínicas y térmicas controladas y constantes y en agitación constante a 115 rpm mediante agitadores orbitales, evitando así la sedimentación de las células y la formación de gradientes de luz y/o nutrientes. La iluminación de 100 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fue proporcionada por tubos fluorescentes (Philips TLD) de 36W y aplicada con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. La temperatura se mantuvo a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Dos veces a la semana se realizó la renovación del cultivo para mantenerlo en la fase exponencial de crecimiento.

3.3. Descripción de *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin

La cepa utilizada de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin fue aislada de las aguas de la Ría de Arousa por el Dr. J. Fábregas (Universidad de Santiago de Compostela) y mantenida en condiciones estables en el laboratorio de Microbiología de la UDC.

P. tricornutum, es la única representante del suborden Phaeodactylinae, la familia Phaeodactylaceae y el género *Phaeodactylum*. Está incluida dentro del orden Naviculales y de la clase Bacillariophyceae. Es una diatomea marina unicelular que presenta una distribución mundial, pero su principal hábitat son las aguas costeras (Martin-Jézéquel & Tesson, 2012). Existen en tres formas: ovalada, fusiforme y trirradiada (**Fig. 3**) (Listwan *et al.*, 2018), siendo la fusiforme la predominante de nuestros cultivos.

Son organismos diploides en su estado vegetativo y no se ha descrito la reproducción sexual en esta especie (Martin-Jézéquel & Tesson, 2012).

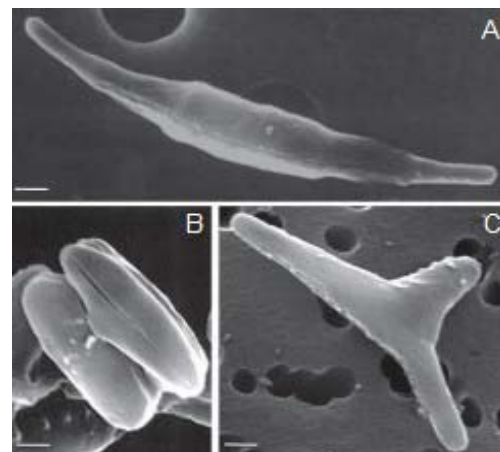


Figura 3. Micrografías electrónicas de barrido de *Phaeodactylum tricornutum*. (A) Célula fusiforme (B) Dos células ovaladas. (C) Célula trirradiada. Escala horizontal = 1 μm (Martino *et al.*, 2007).

3.4. Condiciones de cultivo de *Phaeodactylum tricornutum*

El cultivo de *P. tricornutum* se realizó en agua de mar natural, filtrada a través de un filtro de 0,22 μm de tamaño de poro y esterilizada en autoclave a 120°C durante 20 min, a la que se añadió el medio Algal-1 (Herrero *et al.*, 1991), a una concentración final de nitrógeno de 4 mM. Este medio se preparó a partir de dos soluciones, una de macronutrientes y otra de oligoelementos y vitaminas, que se realizaron en agua destilada natural y se esterilizaron por separado en autoclave a 120 °C durante 20 min; posteriormente se mezclaron y la mezcla se almacenó a 4 °C en oscuridad. La composición final del medio de cultivo se detalla en el ANEXO I.

Los cultivos *stock*, a partir de los cuales se toman los inóculos para llevar a cabo las distintas experiencias, se realizaron de la misma manera y con las mismas condiciones que en el caso de *C. reinhardtii*.

3.5. Diseño experimental

Para este estudio se utilizó el anti-inflamatorio DF comercializado por Sigma-Aldrich. Antes de cada experiencia se preparó una nueva solución *stock* de DF, en eppendorf estériles, disolviendo dicho compuesto puro en metanol. A cada uno de los cultivos de *C. reinhardtii* y *P. tricornutum* se le añadió un volumen determinado de esta solución *stock* de DF para obtener las diferentes concentraciones finales ensayadas. En todos los casos, el volumen añadido de contaminante nunca excede el 0,05 % del volumen final del cultivo. Los controles se realizaron con metanol ya que previamente se comprobó que no había diferencias significativas entre los cultivos con y sin dicho solvente (Prueba t de Student; $p > 0,05$).

Para evaluar los potenciales efectos tóxicos del DF sobre las células de las dos microalgas, se realizaron **experiencias de 24 h**, exponiendo a las células a distintas concentraciones: 0 mg L⁻¹ (control), 50 mg L⁻¹, 100 mg L⁻¹, 125 mg L⁻¹, y 150 mg L⁻¹, realizando dos réplicas para cada concentración. En el caso de *C. reinhardtii*, las experiencias se mantuvieron hasta las 96 h.

Los cultivos experimentales, tanto para *C. reinhardtii* como para *P. tricornutum*, se establecieron a partir de un inóculo procedente del cultivo *stock* en fase de crecimiento exponencial y se realizaron en matraces Pyrex de 100 mL, conteniendo 25 mL de cultivo cada uno, a una densidad inicial de 2×10^5 células mL⁻¹. Estos cultivos se mantuvieron en

una cámara con las mismas condiciones que los cultivos *stock* y a las 24 y 96 h se tomaron muestras para llevar a cabo los diferentes análisis.

3.6. Determinación espectrofotométrica de pigmentos fotosintéticos

Para el **análisis espectrofotométrico de los pigmentos fotosintéticos**, primero se recogieron las células mediante la centrifugación de un volumen determinado de cada cultivo en una centrífuga refrigerada ALC PK121R durante 15 minutos a 4500 r.p.m. a 4°C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y la biomasa se resuspendió en un volumen determinado de acetona al 90% (v:v) para extraer los pigmentos, manteniéndolo durante 24 h a 4°C y en oscuridad. El extracto se centrifugó de nuevo para retirar los restos celulares y con el sobrenadante se realizaron lecturas de absorbancia a diferentes longitudes de onda frente a un blanco de acetona al 90%, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700.

En el caso de *C. reinhardtii* se calcularon las concentraciones de clorofilas *a* y *b* mediante las ecuaciones de Jeffrey y Humphrey (1975) y los carotenoides mediante la ecuación de Strickland y Parsons (1972):

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

$$\text{Clorofila } b = 20,36 \cdot A_{647} - 5,50 \cdot A_{664}$$

$$\text{Carotenoides totales} = 4,0 \cdot A_{480}$$

dónde clorofila *a* y *b* y carotenoides totales representan las concentraciones de dichos pigmentos en $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extracto, y A_{664} , A_{647} y A_{480} representan las absorbancias ($\text{DO} = \log I_0/I$) medidas a 664, 647 y 480 nm, respectivamente.

En el caso de *P. tricornutum* se calcularon las concentraciones de clorofila *a* y clorofila *c* (c_1+c_2) mediante las ecuaciones de Jeffrey y Humphrey (1975):

$$\text{Clorofila } a = 11,47 A_{664} - 0,4 A_{630}$$

$$\text{Clorofila } c_1+c_2 = 24,36 A_{630} - 3,73 A_{664}$$

dónde clorofila *a* y clorofila c_1+c_2 representan las concentraciones de dichos pigmentos en $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extracto, y A_{664} , y A_{630} representan las absorbancias ($\text{DO} = \log I_0/I$) medidas a 664 y 630 nm, respectivamente.

3.7. Determinación del rendimiento o eficiencia fotosintética

El **rendimiento o eficiencia fotosintética** (*Quantum Yield, QY*), se analizó por **fluorometría mediante PAM** (por sus siglas en inglés; *Pulse Amplitude Modulation*), utilizando el fluorímetro portátil Aquapen C-AP-C100 (Photon Systems Instruments). Para realizar las mediciones, se tomaron 3 mL de cada uno de los cultivos y se mantuvieron 30 minutos en oscuridad para garantizar que todos los centros de reacción del fotosistema II (PSII) estuviesen abiertos. Posteriormente, dichas alícuotas se iluminaron por el dispositivo, produciéndose la reducción o cierre de los centros de reacción del PSII y la captación de luz por parte de los fotosistemas a través de los pigmentos fotosintéticos. Cuando estos fotosistemas están funcionando a la máxima capacidad para absorber la luz, parte del exceso de energía que no es utilizada por el PSII, se reemite como fluorescencia, la cual, es medida por el dispositivo y utilizada para calcular la eficiencia fotosintética o QY. Cuanto mayor sea el valor de QY, menor será la fluorescencia en condiciones de saturación de luz y, por lo tanto, mayor será la capacidad fotosintética (Maxwell & Jonhson, 2000).

3.8. Análisis por citometría de flujo

El análisis por citometría de flujo (FCM) de las células microalgales se llevó a cabo en un citómetro Gallios (Beckman Coulter Inc.) equipado con dos láseres de excitación como fuente de luz, uno que emite a 488 nm (luz azul) y otro que emite a 633 nm (luz roja). Este citómetro presenta detectores de luz refractada en el ángulo anterior (*forward scatter light, FS*) y de luz refractada en el ángulo lateral (*side scatter light, SS*). Además, presenta 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 llevar a cabo 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 2×10^5 células mL⁻¹. Para todos los parámetros ensayados se utilizó como fuente de iluminación el láser de excitación a 488 nm y se analizaron como mínimo 10.000 células.

Los fluorocromos utilizados se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO) y se conservaron a -20 °C en oscuridad, a excepción del ioduro de propidio (IP), que se preparó en tampón PBS y que se conservó a 4 °C.

Los resultados de los análisis se presentan en forma de histogramas de distribución de la población celular con respecto a los parámetros analizados. Estos resultados se analizaron, en modo logarítmico y se tomaron datos de medias (u.a.) y/o de porcentajes (%) para la o las poblaciones celulares identificadas en el citograma mediante el programa *Gallios Software*. Los datos obtenidos son recogidos utilizando archivos *listmode*.

3.8.1. Determinación de la densidad celular

La **densidad celular** de los cultivos, expresada en células mL⁻¹, se determinó, mediante recuento por FCM del número de células microalgales presentes en cada uno de los cultivos, utilizando una suspensión de fluorosferas de calibrado, *Flow-Count Fluorospheres* (Beckman Coulter Inc.), con una concentración y rango de emisión de fluorescencia conocidos, como referencia interna a todas las muestras celulares.

Las **tasas de crecimiento** (μ), expresadas en día⁻¹, se calcularon mediante la siguiente fórmula:

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

donde (t₀) y (t) son el tiempo inicial y final del período estudiado, ambos expresados en días, y (N_t) y (N₀) el número de células mL⁻¹ en esos tiempos.

La **concentración efectiva media** (*Effective Concentration 50%*, EC₅₀), es decir, la concentración del tóxico ensayado que provoca una disminución de la tasa de crecimiento del 50% con respecto al control, se obtuvo mediante interpolación gráfica en las curvas de concentración-respuesta usando el programa *CompuSyn*.

3.8.2. Determinación de las propiedades inherentes celulares

Se analizaron, mediante FCM, el **tamaño o volumen celular**, la **complejidad intracelular** y la **autofluorescencia** de las microalgas expuestas a las diferentes concentraciones de DF. Estos parámetros se estudian directamente a partir de las células en suspensión, sin utilizar ningún fluorocromo.

El **tamaño o volumen celular** es proporcional a las medidas del detector que recoge la luz refractada en el ángulo anterior (*forward scatter light*, FS), es decir, la luz dispersada entre 1 y 20° con respecto al eje del rayo láser (Shapiro, 1995).

La **estructura intracelular o granularidad** celular se correlaciona con la luz refractada en el ángulo lateral (*side scatter light*, SS), a 90° respecto el haz (Shapiro, 1995).

Los organismos fotosintéticos, como las plantas y las algas, presentan una autofluorescencia característica, debido a la presencia de clorofila u otros pigmentos accesorios (Shapiro, 1995). La **fluorescencia de la clorofila a** (pigmento mayoritario en todas las células microalgales) se excita con luz a 488 nm y emite en el rango de 680-720 nm, por lo que la autofluorescencia microalgal se recoge en el detector FL4 (Esperanza, 2017).

3.8.3. Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad celular se analizó mediante citometría de flujo, empleando dos fluorocromos ampliamente utilizados en estudios de toxicidad: el yoduro de propidio (IP) y el diacetato de fluoresceína (FDA).

Ioduro de propidio

El **yoduro de propidio (IP)** es un fluorocromo que se intercala entre los pares de bases de los ácidos nucleicos de doble cadena (tanto ADN como ARN), produciendo fluorescencia roja (con emisión máxima a 617 nm) cuando es excitado con luz azul (488 nm) (Ormerod, 2008). La membrana celular es impermeable a este fluorocromo, por lo que no es capaz de penetrar al interior celular cuando las células son viables. Sin embargo, cuando las células están dañadas y la integridad de su membrana plasmática se ve alterada, el IP es capaz de penetrar al interior celular y unirse a los ácidos nucleicos (Crowley *et al.*, 2016). 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) en escala logarítmica. Las suspensiones microalgales se incuban con una concentración final de IP de 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, durante 10 min, en oscuridad y a temperatura ambiente (Prado *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de células viables (IP-) con respecto al total de células analizadas.

Diacetato de fluoresceína

El **diacetato de fluoresceína** (*fluorescein diacetate*, FDA) es un éster no polar, lipofílico y no fluorescente, que penetra libremente en las células vivas atravesando la membrana celular. Una vez dentro, la molécula de FDA pierde los grupos de acetato debido a la hidrólisis de los enlaces éster por acción de esterasas citoplasmáticas no específicas presentes en las células metabólicamente activas. Como resultado, se libera fluoresceína, una molécula polar, hidrofílica y altamente fluorescente que queda retenida, únicamente, dentro de aquellas células que tengan la membrana plasmática intacta, lo que permite su uso como indicador de viabilidad. De este modo, se puede distinguir entre células fluorescentes metabólicamente activas (FDA+), que serán células viables, y células no fluorescentes metabólicamente no activas (FDA-), que 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).

La fluoresceína emite fluorescencia en longitudes de onda dentro del espectro verde (525-530 nm), recogiendo en el detector FL1 (505-545 nm) en escala logarítmica. Las suspensiones microalgales se incuban con una concentración final de FDA de 0,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ durante 15 min, en oscuridad y a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de células activas viables (FDA+) con respecto al total de células analizadas. Dentro de la población metabólicamente activa (FDA+), se analizaron también las variaciones en la actividad metabólica celular, a través de los valores medios de fluorescencia (u.a.), para estudiar la actividad esterasa inespecífica.

3.8.4. Análisis *in fluxo* de la actividad esterasa inespecífica a tiempo real

Para completar el estudio de la actividad esterasa inespecífica, como una medida de la actividad metabólica *in vivo* de las células microalgales, adicionalmente, se realizaron ensayos cinéticos *in fluxo* que se basan, al igual que en el caso anterior, en la generación de fluorescencia derivada de la hidrólisis enzimática del FDA. Tal y como se explicó anteriormente y, dado que la intensidad de la señal fluorescente emitida por la fluoresceína es proporcional a la cantidad de fluorocromo acumulado y el tiempo transcurrido, podemos medir la actividad metabólica celular (Prado *et al.*, 2009). Así, comparando las diferencias entre la fluorescencia emitida por las células metabólicamente activas (FDA+), es posible detectar cambios o alteraciones en la actividad metabólica.

Inicialmente se prepararon suspensiones celulares de 1 mL y 2×10^5 células mL⁻¹ en PBS, y se analizaron en el citómetro sin teñir durante 10 s para ajustar la línea base de autofluorescencia verde de las células. Posteriormente se detuvo la adquisición y se añadió, rápidamente, el volumen de FDA necesario para obtener una concentración final de 0,8 µg mL⁻¹. A continuación, se reanudó la adquisición y se analizaron los cambios en el detector FL1 log frente al tiempo, hasta que la fluorescencia comenzó a estabilizarse.

Mediante citogramas biparamétricos, se analizó el incremento de la fluorescencia verde de la fluoresceína (FL1 log; eje *y*), a lo largo del tiempo de incubación (eje *x*). Para calcular la actividad metabólica de las células microalgales, se obtuvieron las medias de fluorescencia (u.a.) de la fluoresceína para diferentes tiempos de incubación y se representó, para cada citograma, los valores medios de fluorescencia FL1 obtenidos frente al tiempo, desde que se añadió el fluorocromo hasta que la señal de fluorescencia se estabilizó. Posteriormente, se ajustó la curva obtenida a una función polinomial lineal con un coeficiente de R² superior a 0,95, y se obtuvo la ecuación de la recta, a partir de la cual, calculamos la pendiente, que es asimilable a la tasa de generación de fluorescencia verde (u.a. min⁻¹) y, por lo tanto, a la actividad esterasa inespecífica de las células microalgales.

3.8.5. Determinación del pH intracelular

Para determinar el pH intracelular (pHi) se utilizó 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 (BCECF AM)**, una molécula no fluorescente que atraviesa libremente la membrana celular. Una vez dentro de la célula, las esterases intracelulares no específicas rompen el enlace éster y liberan la molécula BCECF, que presenta fluorescencia pH-dependiente y carga negativa, quedando retenida en el interior celular de las células viables (Musgrove *et al.*, 1986; Han & Burgess, 2010). Su pKa es de 6,98 y, por lo tanto, es muy adecuado para el estudio del pH citosólico (6,5–7,5). En caso de acidificación, el BCECF se protonaría y se reduciría su intensidad de fluorescencia y, en caso de alcalinización, se produciría un aumento de la fluorescencia (Araniti *et al.*, 2018).

La fluorescencia del BCECF se analiza en los detectores FL1 (505-545 nm) y FL3 (605-635 nm) en escala logarítmica. En el FL1 se recoge la emisión de fluoresceína, reflejo de la cantidad de fluorocromo que es hidrolizado en la célula, y en el FL3 se recoge la emisión del fluorocromo dependiente del pH. Por ello, se utiliza la relación FL1/FL3 para calcular el pHi, independientemente de la concentración intracelular de fluorocromo (Seoane, 2018).

Las suspensiones microalgales se incuban con una concentración final de BCECF AM de $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ durante 40 min, en oscuridad y a temperatura ambiente.

3.8.6. Determinación del potencial de membrana citoplasmática

Para estudiar este parámetro se utilizó el fluorocromo bis-(1,3-ácido dibutilbarbitúrico) trimetino oxonol (*bis-(1,3-dibutylbarbituric acid trimethine oxonol, DiBAC₄(3))*). El DiBAC₄(3) es una molécula aniónica que penetra con facilidad a través de las membranas celulares relativamente despolarizadas y, una vez dentro de la célula, es retenido por su 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 (Epps *et al.*, 1994; Jepras *et al.*, 1995).

La fluorescencia del DiBAC₄(3) se analiza en el detector FL1 (505-545 nm) en escala logarítmica. Las suspensiones microalgales se incuban con una concentración final de DiBAC₄(3) de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ durante 10 min, en oscuridad y a temperatura ambiente (Prado, 2010). Los resultados obtenidos se expresan como la media de la fluorescencia (u.a.) recogida en el detector FL1.

3.8.7. Análisis del estrés oxidativo

En este trabajo se estudió la producción intracelular de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como medida del estrés oxidativo de las células microalgales, utilizando el indicador **dihidrorodamina 123 (DHR 123)**. Se trata de un fluorocromo incoloro que difunde libremente a través de la membrana citoplasmática. Dentro de las células, dicho compuesto se oxida por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente por H_2O_2 , dando lugar a la rodamina 123, una molécula fluorescente (emisión máxima a 529 nm), catiónica y lipofílica, que queda retenida en el interior celular, generalmente en las mitocondrias (Kiani-Esfahani *et al.*, 2012; O'Connor *et al.*, 2017).

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 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, durante 40 min, en oscuridad y a temperatura ambiente (Prado, 2010). Los resultados obtenidos se expresan como la media de la fluorescencia (u.a.) recogida en el detector FL1.

3.9. Análisis estadístico

En primer lugar, para los análisis de los diferentes parámetros, se calcularon las medias y las desviaciones estándar de las dos réplicas para los cultivos expuestos a DF y para el control.

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el programa estadístico **IBM SPSS Statistic** versión 22.0.0. En primer lugar, se verificaron los datos para determinar la distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk) y la homogeneidad de la varianza (prueba de Levene). Posteriormente, para cada experiencia, la hipótesis de que la concentración del DF del medio no afecta al parámetro de estudio, se analizó estadísticamente mediante un **análisis de la varianza de una vía (ANOVA)**. Cuando la hipótesis fue rechazada, se utilizó el **test de Dunnett** para determinar las diferencias de cada tratamiento con respecto al control. En todos los casos se aplicó un nivel de significación de 0,05 ($p \leq 0,05$).

Las gráficas se crearon con el paquete de análisis estadístico y de gráficas avanzadas **SigmaPlot** versión 12.0.

4. RESULTADOS

4.1. Crecimiento

Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas en el crecimiento de *C. reinhardtii* expuesta a concentraciones de DF entre 50 y 150 mg L⁻¹, durante 96 h, con respecto al control (**Tabla 1**), por lo que no se pudo calcular la EC₅₀.

Por el contrario, el crecimiento de *P. tricornutum* se ve negativamente afectado por la presencia de DF en el medio de cultivo tras 24 h de exposición, tal y como reflejan los resultados de densidad celular (**Tabla 1**). El efecto tóxico se puede observar ya desde la concentración más baja ensayada (50 mg L⁻¹), que ya muestra una densidad celular significativamente inferior ($p < 0,05$) a la observada en los cultivos control, y va aumentando conforme aumenta dicha concentración.

Las tasas de crecimiento (T.C.) de *P. tricornutum* calculadas a las 24 h (**Tabla 1**) también muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) y, del mismo modo que con la densidad celular, se produce un efecto tóxico a partir de 50 mg L⁻¹ de DF y va aumentando conforme aumenta dicha concentración, observando que las concentraciones más altas ensayadas (125 y 150 mg L⁻¹) incluso llegan a inhibir por completo el crecimiento.

En base a los datos de T.C. tras 24 h de exposición a DF, la EC₅₀ fue 55,4 mg L⁻¹ para la diatomea *P. tricornutum*.

Tabla 1. Densidad celular y tasa de crecimiento de los cultivos de *C. reinhardtii* tras la exposición a diferentes concentraciones de DF durante 24 y 96 h y de *P. tricornutum*, durante 24 h. Los valores representan la media de las dos réplicas \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas con respecto al control se representan con un asterisco ($p < 0,05$).

Diclofenaco (mg L ⁻¹)	<i>C. reinhardtii</i>				<i>P. tricornutum</i>	
	24 h		96 h		24 h	
	Densidad celular (cél x 10 ⁵ mL ⁻¹)	T. C. (μ) (día ⁻¹)	Densidad celular (cél x 10 ⁵ mL ⁻¹)	T. C. (μ) (día ⁻¹)	Densidad celular (cél x 10 ⁵ mL ⁻¹)	T. C. (μ) (día ⁻¹)
Control	2,84 \pm 0,14	0,46 \pm 0,07	14,8 \pm 0,40	2,84 \pm 0,04	4,19 \pm 0,03	0,80 \pm 0,01
50	2,58 \pm 0,04	0,32 \pm 0,02	14,8 \pm 0,40	2,84 \pm 0,04	3,10 \pm 0,12*	0,37 \pm 0,06*
100	3,18 \pm 0,30	0,62 \pm 0,14	13,7 \pm 0,10	2,73 \pm 0,01	2,64 \pm 0,03*	0,14 \pm 0,01*
125	3,11 \pm 0,03	0,59 \pm 0,01	12,7 \pm 2,10	2,60 \pm 0,24	2,44 \pm 0,06*	0,02 \pm 0,04*
150	3,25 \pm 0,07	0,66 \pm 0,03	14,3 \pm 4,50	2,72 \pm 0,47	2,37 \pm 0,09*	0,00 \pm 0,05*

4.2. Pigmentos fotosintéticos

En el caso de los cultivos de *C. reinhardtii*, después de 24 h de exposición al DF, se produce una pequeña disminución del contenido celular de clorofilas *a* y *b* y carotenoides a medida que aumenta la concentración de DF (Fig. 4.A), si bien dichas diferencias no son significativas ($p > 0,05$). A las 96 h de exposición, la tendencia varía, produciéndose un pequeño aumento del contenido de pigmentos en las concentraciones más altas, comparado con los resultados obtenidos a las 24 h (Fig. 4.B) de forma que se mantiene más o menos constante, independientemente de la concentración de DF ensayada, y sin mostrar diferencias significativas ($p > 0,05$).

En el caso de *P. tricornutum*, los resultados indican que, tras 24 h de exposición, el contenido total de clorofila *a* y clorofila *c* en *P. tricornutum* tampoco presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto al control (Fig. 4.C).

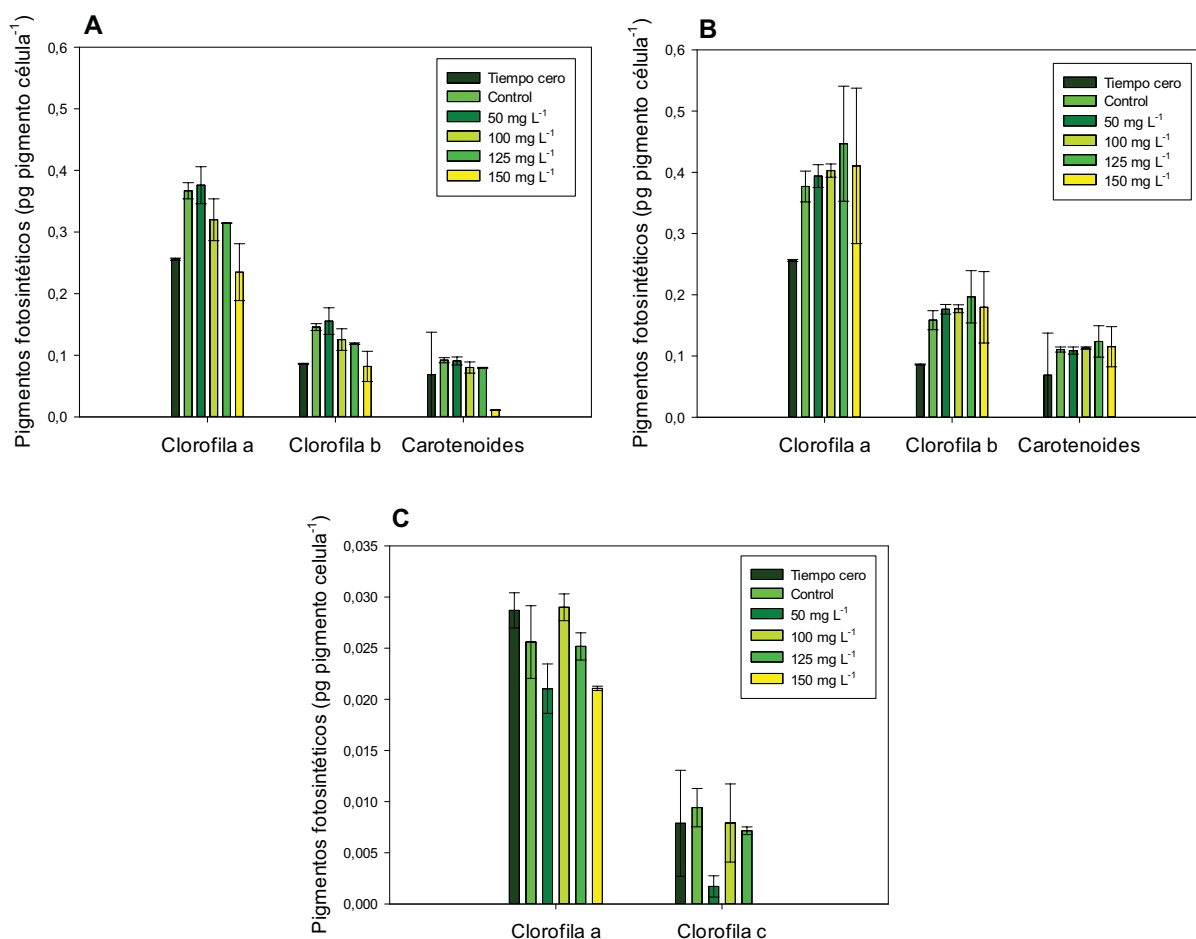


Figura 4. Contenido celular de pigmentos fotosintéticos de los cultivos de *C. reinhardtii* después de 24 (A) y 96 h (B) de exposición a diferentes concentraciones de DF, y de *P. tricornutum* tras 24 h de exposición (C). Los valores representan la media de las dos réplicas \pm la desviación estándar.

4.3. Eficiencia fotosintética

La eficiencia fotosintética de *C. reinhardtii* se ve negativamente afectada por la presencia de DF. La disminución es significativa a partir de una concentración de 100 mg L⁻¹ (p<0,05) y se mantiene en las concentraciones más altas (**Tabla 2**).

Los datos obtenidos de *P. tricornutum* también muestran una disminución de la eficiencia fotosintética conforme aumenta la concentración de DF a la que están expuestos los cultivos. Esta disminución es significativa (p<0,05) a partir de una concentración de 125 mg L⁻¹ y disminuye aún más a la concentración más alta ensayada (**Tabla 2**).

Tabla 2. Eficiencia fotosintética de las células de *C. reinhardtii* y *P. tricornutum* tras 24 h de exposición a las distintas concentraciones de DF. Los valores representan la media de las dos réplicas ± la desviación estándar. Las diferencias significativas se representan con un asterisco (p<0,05).

Diclofenaco (mg L ⁻¹)	Eficiencia fotosintética	
	<i>C. reinhardtii</i>	<i>P. tricornutum</i>
Control	0,69 ± 0,01	0,65 ± 0,01
50	0,67 ± 0,01	0,62 ± 0,00
100	0,64 ± 0,01*	0,65 ± 0,01
125	0,66 ± 0,01*	0,60 ± 0,01*
150	0,64 ± 0,00*	0,55 ± 0,00*

4.4. Propiedades inherentes

La exposición a DF durante 24 y 96 h no induce alteraciones significativas (p<0,05) en el tamaño, complejidad y autofluorescencia de las células de *C. reinhardtii* (**Tabla 3**).

Tabla 3. Propiedades inherentes de las células de *C. reinhardtii* tras 24 y 96 h de exposición a las distintas concentraciones de DF. Los valores representan la media (u.a.) de las dos réplicas ± la desviación estándar.

Diclofenaco (mg L ⁻¹)	<i>C. reinhardtii</i>					
	24 h			96 h		
	Tamaño celular relativo FS (u.a.)	Complejidad intracelular SS (u.a.)	Autofluorescencia FL4 (u.a.)	Tamaño celular relativo FS (u.a.)	Complejidad intracelular SS (u.a.)	Autofluorescencia FL4 (u.a.)
Control	602 ± 21,0	276 ± 12,0	329 ± 9,00	516 ± 9,50	326 ± 19,0	355 ± 15,0
50	577 ± 18,0	272 ± 8,50	315 ± 15,0	463 ± 37,5	250 ± 4,00	314 ± 0,00
100	567 ± 2,00	272 ± 8,60	288 ± 9,00	528 ± 2,00	299 ± 17,0	361 ± 6,50
125	568 ± 0,00	275 ± 1,00	288 ± 3,00	499 ± 11,5	300 ± 8,50	360 ± 0,50
150	561 ± 5,50	265 ± 1,50	277 ± 3,50	505 ± 14,0	293 ± 16,0	320 ± 45,0

En el caso de *P. tricornutum*, la exposición de los cultivos a las distintas concentraciones de DF durante 24 h, induce alteraciones significativas ($p < 0,05$) con respecto al control en la complejidad y la autofluorescencia de las células de *P. tricornutum*, pero no en el tamaño celular ($p > 0,05$) (**Tabla 4**).

A las concentraciones más bajas de DF (50 y 100 mg L⁻¹) el **tamaño** de las células de *P. tricornutum* expuestas, aumenta levemente con respecto a las células control, sin embargo este aumento no es significativo ($p > 0,05$) (**Tabla 4**).

La **complejidad intracelular** de *P. tricornutum* disminuye significativamente ($p < 0,05$) a partir de una concentración de 100 mg L⁻¹ de DF y se mantiene a concentraciones más altas (**Tabla 4**).

Los resultados obtenidos muestran que la **autofluorescencia de la clorofila a** en las células de *P. tricornutum* se ve negativamente afectada por la presencia de DF. El efecto tóxico se produce a partir de una concentración de 100 mg L⁻¹, cuando los cultivos muestran una autofluorescencia significativamente inferior ($p < 0,05$) a la observada en los cultivos control (**Tabla 4**), y se va incrementando conforme aumenta la concentración de DF en el medio.

Tabla 4. Propiedades inherentes de las células de *P. tricornutum* tras 24 h de exposición a diferentes concentraciones de DF. Los valores representan la media de las dos réplicas \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas con respecto al control se representan con un asterisco ($p < 0,05$).

Diclofenaco (mg L ⁻¹)	<i>P. tricornutum</i>		
	Tamaño celular relativo FS (u.a.)	Complejidad intracelular SS (u.a.)	Autofluorescencia FL4 (u.a.)
Control	606 \pm 25,5	152 \pm 2,00	290 \pm 0,00
50	678 \pm 12,5	156 \pm 0,00	291 \pm 1,50
100	665 \pm 7,00	128 \pm 0,00*	274 \pm 0,50*
125	604 \pm 22,0	125 \pm 5,00*	259 \pm 1,00*
150	598 \pm 2,00	129 \pm 1,00*	244 \pm 1,00*

4.5. Viabilidad celular

Ioduro de propidio

La viabilidad celular de los cultivos, tanto de *C. reinhardtii* como de *P. tricornutum*, no se ven significativamente afectados ($p > 0,05$) por la exposición a DF, ya que se mantienen por encima del 96% para todas las concentraciones ensayadas (**Tabla 5**).

Tabla 5. Viabilidad celular de los cultivos de *C. reinhardtii* y *P. tricornutum*, tras 24 h de exposición a las distintas concentraciones de DF, expresada como el porcentaje de células IP- sobre el total de células analizadas. Los valores representados se corresponden con la media del % de las dos réplicas \pm la desviación estándar.

Diclofenaco (mg L ⁻¹)	Viabilidad celular (% IP-)	
	<i>C. reinhardtii</i>	<i>P. tricornutum</i>
Control	98,90 \pm 0,30	98,45 \pm 0,15
50	96,85 \pm 0,55	99,20 \pm 0,21
100	98,40 \pm 0,60	99,20 \pm 1,80
125	98,65 \pm 0,25	96,50 \pm 0,00
150	98,85 \pm 0,05	96,60 \pm 0,90

Diacetato de fluoresceína

Al igual que con el IP, el porcentaje de células viables en los cultivos de *C. reinhardtii* analizado con FDA, no se ve significativamente afectado ($p < 0,05$) tras 24 y 96 h de exposición a DF, ya que se mantiene cerca del 100% en todas las concentraciones ensayadas (**Tabla 6**).

En el caso de *P. tricornutum*, no se pudieron llevar a cabo los análisis con FDA porque las células no se tiñeron adecuadamente con el protocolo utilizado.

Tabla 6. Viabilidad celular de los cultivos de *C. reinhardtii*, tras 24 y 96 h de exposición a las distintas concentraciones de DF, expresada como el porcentaje de células FDA+ sobre el total de células analizadas. Los valores representados se corresponden con la media del % de las dos réplicas \pm la desviación estándar.

Diclofenaco (mg L ⁻¹)	Viabilidad celular (%FDA+)	
	24 h	96 h
Control	97,05 \pm 1,05	94,00 \pm 1,80
50	97,35 \pm 0,15	94,70 \pm 2,50
100	96,95 \pm 0,75	97,10 \pm 0,00
125	97,25 \pm 0,05	96,65 \pm 0,65
150	97,30 \pm 0,30	97,30 \pm 0,30

4.6. Actividad metabólica

Los resultados obtenidos del valor medio (u.a.) de la fluorescencia del FDA, indican que esta fluorescencia disminuye significativamente ($p < 0,05$) en los cultivos expuestos a DF durante 24 y 96 h con respecto al control, lo que indica una reducción de la actividad esterasa inespecífica. A las 24 h, se observa una disminución de la actividad esterasa que se produce de forma progresiva con el aumento de la concentración de DF (**Fig. 5.A**), y lo hace de forma significativa ($p < 0,05$), a la concentración más alta ensayada. A las 96 h, la tendencia se mantiene (**Fig. 5.B**), pero las diferencias son significativas ($p < 0,05$) ya desde la concentración más baja ensayada.

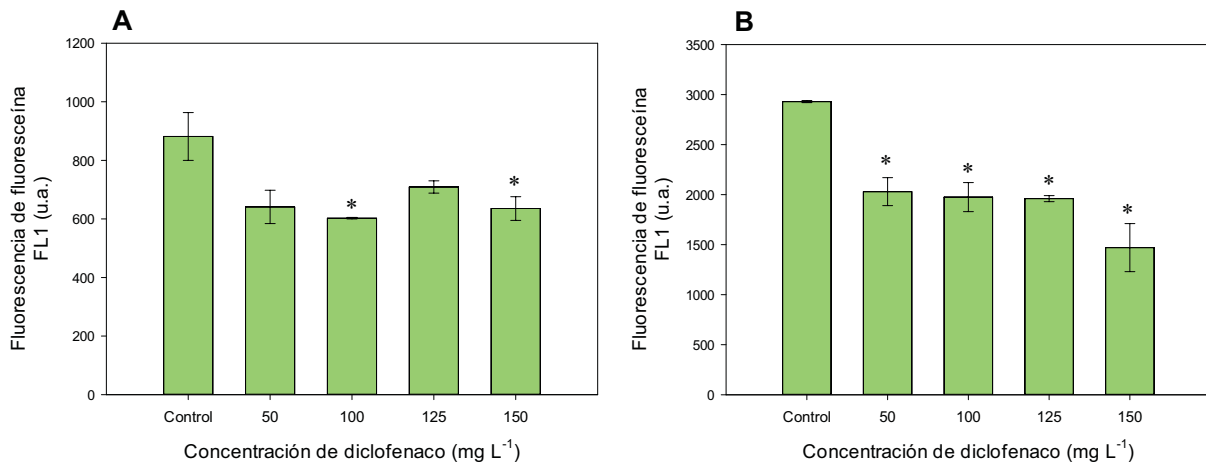


Figura 5. Actividad metabólica de la población metabólicamente activa (FDA+) de los diferentes cultivos de *C. reinhardtii* a las 24 (A) y 96 h (B) de exposición a las diferentes concentraciones de DF. Los valores representan la media (u.a.) de las dos réplicas \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas con respecto al control se representan con un asterisco ($p < 0,05$).

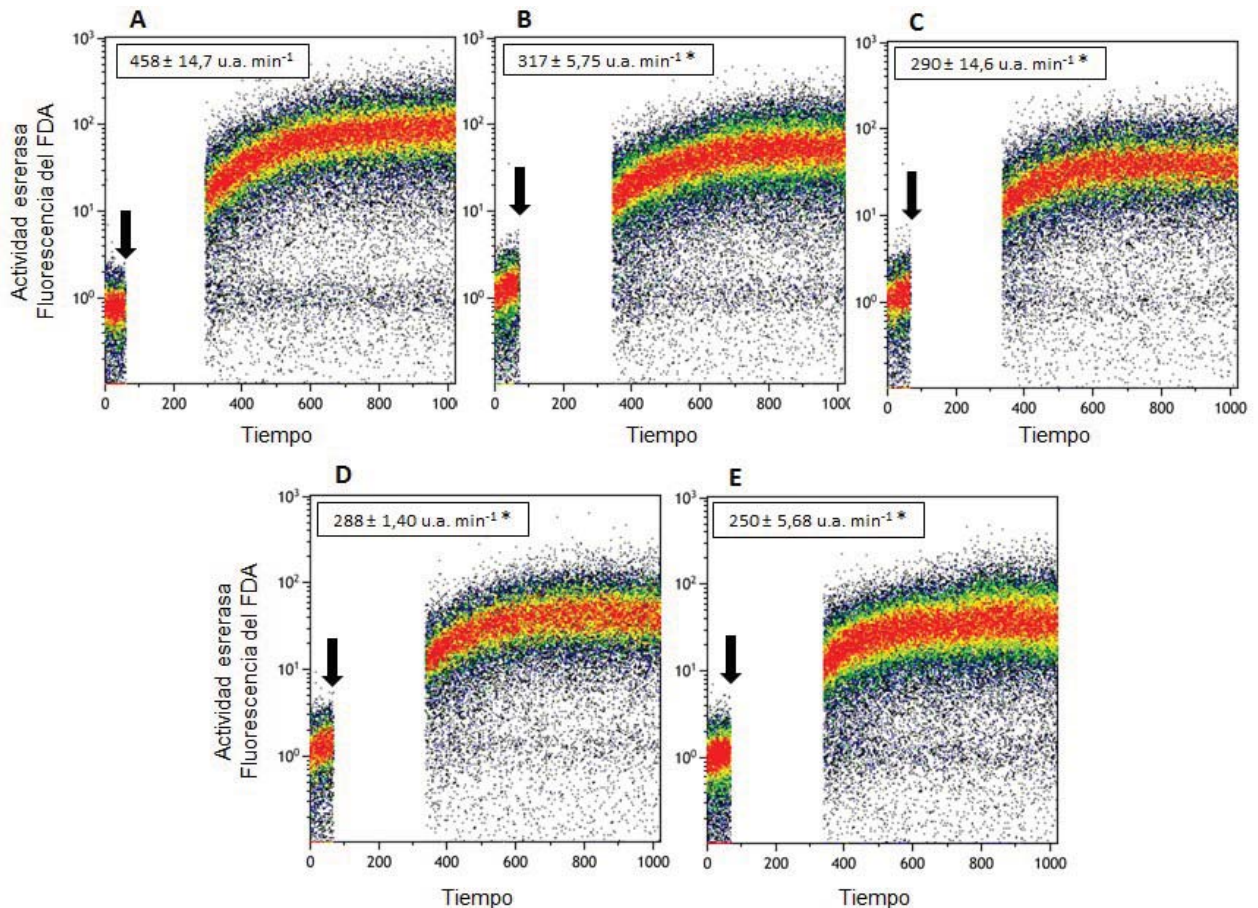


Figura 6. Actividad metabólica de los cultivos de *C. reinhardtii*, (A) Control, (B) 50 mg L⁻¹, (C) 100 mg L⁻¹, (D) 125 mg L⁻¹ y (E) 150 mg L⁻¹, tras 24h de exposición a DF. Las flechas indican el momento de adición del FDA a las suspensiones. La tasa de generación de fluorescencia está expresado en unidades arbitrarias de fluorescencia min⁻¹. Los gráficos cinéticos representan sólo una de las dos réplicas. Los valores representan la media de las dos réplicas \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas con respecto al control se representan con un asterisco ($p < 0,05$).

Los datos del análisis *in fluxo* de la actividad esterasa inespecífica (Fig. 6), al igual que en el análisis anterior, revelan que la exposición a DF induce una reducción significativa ($p < 0,05$) en la actividad metabólica de las células de *C. reinhardtii* con respecto al control. Esta reducción empieza a ser significativa ya desde la concentración más baja (50 mg L^{-1}) con una tasa de generación de fluorescencia de $317 \text{ u.a. min}^{-1}$ frente a $458 \text{ u.a. min}^{-1}$ del control y se va reduciendo progresivamente conforme aumenta la concentración de DF.

4.7. pH intracelular

En el caso de *C. reinhardtii*, los resultados obtenidos indican que la tendencia es la de mantener un pH intracelular constante a pesar de la presencia de DF, ya que no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los diferentes tratamientos y el control (Figura 7.A).

En el caso de *P. tricornutum*, el análisis de pH intracelular (Fig. 8), refleja un aumento significativo ($p > 0,05$) del pH intracelular de las células de *P. tricornutum* expuestas a DF a las concentraciones más altas (125 y 150 mg L^{-1}).

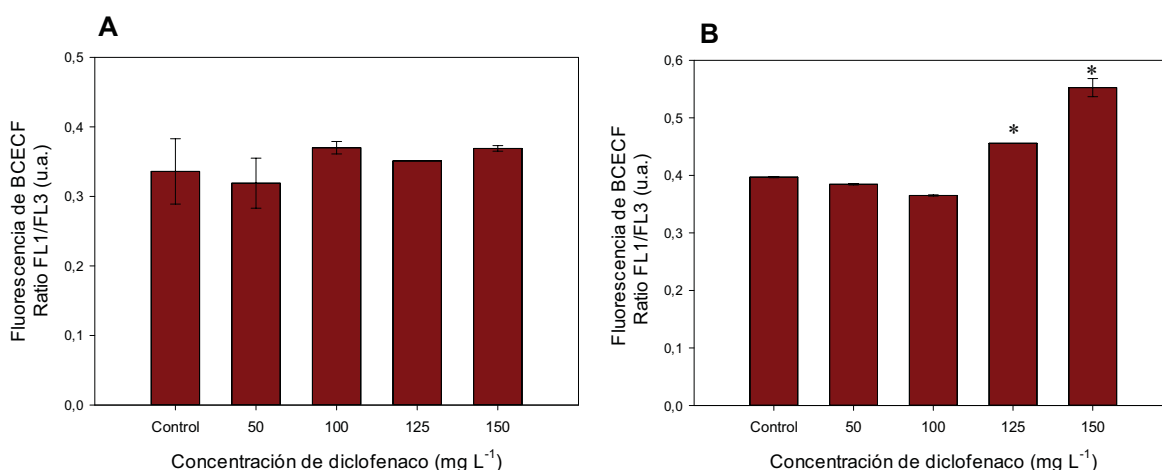


Figura 7. pH intracelular de las células de *C. reinhardtii* (A) y *P. tricornutum* (B) tras 24 h de exposición a las distintas concentraciones de DF. Los valores representados se corresponden con la media (u.a.) de las dos réplicas \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas con respecto al control se representan con un asterisco ($p < 0,05$).

4.8. Potencial de membrana citoplasmática

Los resultados obtenidos en el análisis de DiBAC₄(3) de *C. reinhardtii*, muestran una tendencia a mantener un potencial de membrana constante, ya que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los diferentes tratamientos y el control (Fig. 8.A).

En el caso de *P. tricornutum*, los resultados del análisis (**Fig. 8.B**) indican un aumento de la fluorescencia y, por tanto, una despolarización de la membrana, conforme aumenta la concentración de DF, aunque solo se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$), con respecto al control, a la mayor concentración ensayada (150 mg L^{-1}).

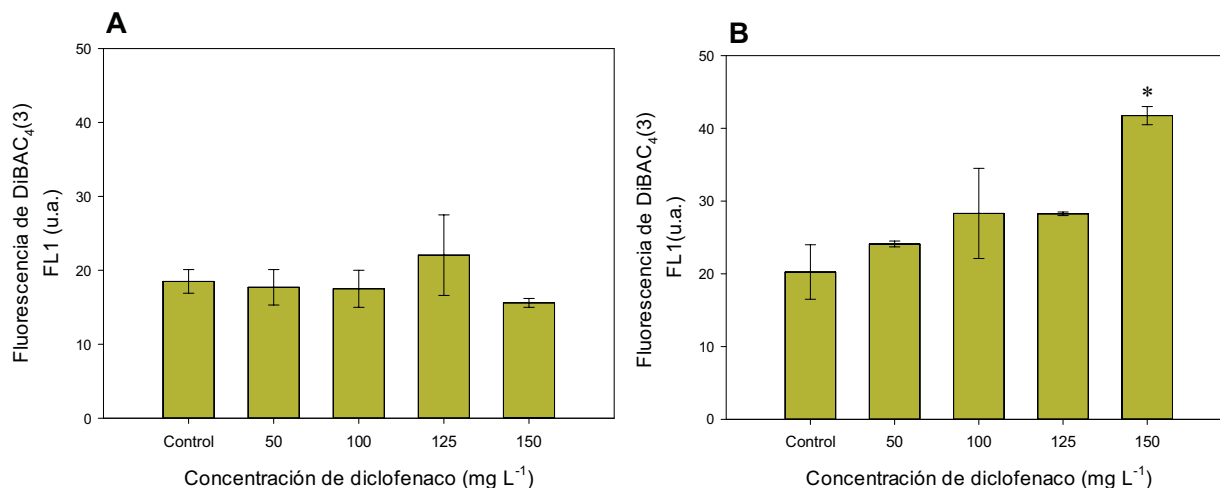


Figura 8. Potencial de membrana citoplasmática de las células de *C. reinhardtii* (A) y *P. tricornutum* (B) tras 24 h de exposición a las distintas concentraciones de DF. Los valores representados se corresponden con la media (u.a.) de las dos réplicas \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas con respecto al control se representan con un asterisco ($p < 0,05$).

4.9. Estrés oxidativo: producción de peróxido de hidrógeno

Tanto para *C. reinhardtii* (**Fig. 9.A**), como para *P. tricornutum* (**Fig. 9.B**), el nivel de peróxido de hidrógeno en las células, tiende a aumentar a concentraciones altas de DF; sin embargo, estas diferencias no son significativas ($p > 0,05$).

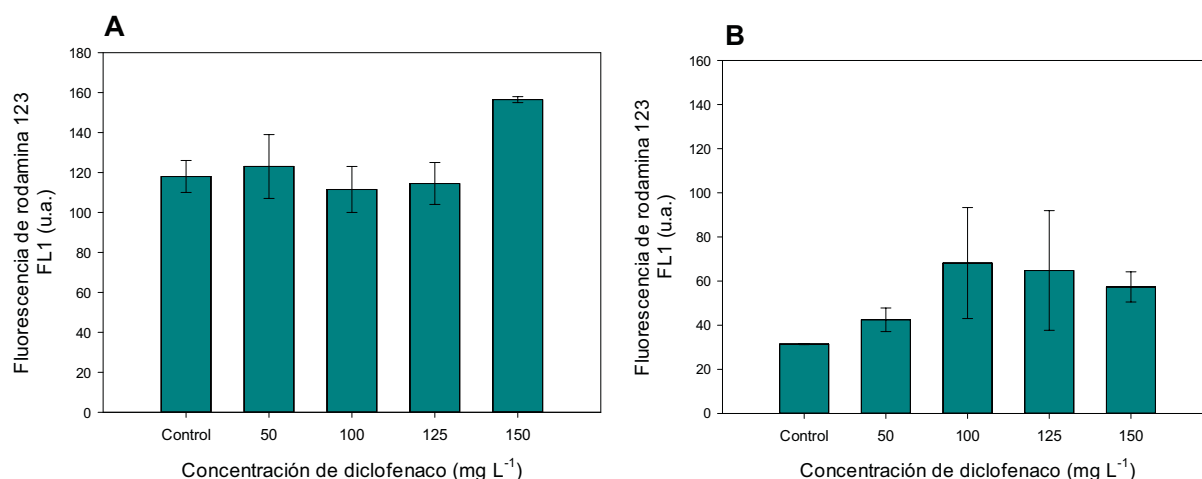


Figura 9. Nivel intracelular de peróxido de hidrógeno de las células de *C. reinhardtii* (A) y *P. tricornutum* (B) tras 24 h de exposición a las distintas concentraciones de DF. Los valores representados se corresponden con la media (u.a.) de las dos réplicas \pm la desviación estándar.

5. DISCUSIÓN

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 más estudiado en las pruebas de toxicidad con microalgas (el 95% de los trabajos publicados o más, lo incluyen). En muchos estudios, también se utilizan índices o tasas basados en los resultados de densidad celular, como la **tasa de crecimiento (μ)** y la **concentración efectiva media (EC_{50})** (Cid *et al.*, 2012; Seoane, 2018).

Los resultados obtenidos en el presente estudio reflejaron que el DF no ejerce un efecto negativo significativo sobre el crecimiento de *C. reinhardtii* tras 96 h de exposición (**Tabla 1**). Estos resultados difieren de los obtenidos por Majeska *et al.*, 2018, quienes sí observaron un descenso significativo de la densidad celular en cultivos de *C. reinhardtii* expuestos a DF a concentraciones similares a las ensayadas en este estudio. Por el contrario, los resultados obtenidos para *P. tricornutum*, sí que mostraron una inhibición del crecimiento provocada por la presencia de DF, ya que, concentraciones iguales o superiores a 50 mg L^{-1} produjeron un descenso significativo en su crecimiento tras 24 h de exposición. Además, se observó que el efecto fue dependiente de la concentración, de modo que, la inhibición del crecimiento, se hizo más evidente cuanto mayor fue la concentración de DF ensayada (**Tabla 1**). En otros estudios se observó que otros PPCPs, entre ellos, el ibuprofeno (otro AINE), también causaron importantes efectos negativos, de forma dependiente a la concentración, sobre el crecimiento de otras microalgas, tanto marinas (Seoane *et al.*, 2017a; Seoane *et al.*, 2017b), como dulceacuícolas (Moro *et al.*, 2014). Sin embargo, también se han observado casos de estimulación del crecimiento u hormesis en microalgas expuestas a bajas dosis de algunos PPCPs, como el ibuprofeno o el paracetamol (Berrebaan *et al.*, 2017; Ding *et al.*, 2017).

Entre los diferentes índices que permiten evaluar el efecto de un contaminante sobre el crecimiento microalgal, el valor de EC_{50} es el más común y se utiliza para comparar los resultados experimentales obtenidos bajo condiciones distintas en diferentes laboratorios (Esperanza, 2017; Seoane, 2018). En este trabajo, el valor de EC_{50} para *C. reinhardtii* no se pudo calcular, ni a las 24 ni a las 96 h de exposición al DF, ya que no se observan cambios significativos en el crecimiento a las concentraciones ensayadas. Los resultados obtenidos por Pino *et al.*, (2016) mostraron un valor de EC_{50} de $1776 \pm 312 \text{ mg L}^{-1}$ para *C.*

reinhardtii expuesta a DF, una concentración mucho más alta que la mayor ensayada en el presente estudio. Por el contrario, Majewska *et al.*, (2018) obtuvieron un valor de EC₅₀, para la misma especie de microalga expuesta al mismo contaminante, de 134 mg L⁻¹.

En el presente estudio, el valor de EC₅₀ para la T.C. de *P. tricornutum* fue de 55,4 mg L⁻¹. Otros estudios con microalgas expuestas a DF también obtuvieron concentraciones de EC₅₀ por debajo de 100 mg L⁻¹ (Cleuvers, 2003, Cleuvers, 2004). Por otro lado, Claessens *et al.*, (2013) obtuvieron valores de EC₅₀ por encima de 200 ng L⁻¹ para *P. tricornutum* expuesta a diferentes fármacos, entre ellos el ácido salicílico y el paracetamol, otro tipo de AINEs.

Otro de los aspectos más controlados, junto con el crecimiento, es la **actividad fotosintética** (Campanella *et al.*, 2001). Se considera uno de los más importantes a estudiar en procesos de toxicidad sobre microalgas (Pino *et al.*, 2016) y se puede analizar a través de diversos parámetros que generalmente están reconocidos como buenos indicadores de estrés. En este trabajo se han utilizado el análisis del **contenido celular de pigmentos fotosintéticos**, la **eficiencia fotosintética** y la **autofluorescencia de la clorofila a**.

En concreto, la variación del **contenido celular de pigmentos fotosintéticos en microalgas** se considera un indicador fiable de la toxicidad por xenobióticos, la inhibición de la fotosíntesis y de procesos metabólicos relacionados con el crecimiento (Moro *et al.*, 2014; Ding *et al.*, 2017). Sin embargo, en este estudio, mostró ser un parámetro no sensible al DF, al menos a las concentraciones ensayadas, ya que no provocó alteraciones significativas con respecto al control en ninguna de las dos especies utilizadas (**Fig. 4**). Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Majewska *et al.*, (2018) en los que se observó que, cultivos de *C. reinhardtii* expuestos a DF, sí sufrieron una disminución del contenido en clorofilas y un aumento significativo del nivel de carotenoides, a concentraciones similares a las ensayadas en este trabajo.

La **eficiencia fotosintética** refleja el estado fisiológico del aparato fotosintético, ya que es una medida de la eficiencia del fotosistema II (Sjollemma *et al.*, 2014). Los resultados mostraron una disminución significativa en ambas especies pero, a pesar de que en *C. reinhardtii*, la disminución ya se detecta a partir de una concentración de 100 mg L⁻¹ y en *P. tricornutum* no se manifestaron diferencias significativas hasta los cultivos con 125 mg L⁻¹ de DF, el efecto tóxico fue más acusado en esta última (**Tabla 2**). La disminución en el rendimiento fotosintético de *C. reinhardtii* expuesto a DF y a otros AINEs ya fue observada por Pino *et al.*, (2016), pero la razón de esta inhibición no ha sido explicada.

Para estudiar aún más a fondo los posibles cambios en la fotosíntesis provocados por la exposición a DF, se analizó también la **fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a***. En el caso de *C. reinhardtii*, no se observaron diferencias significativas a lo largo de 96 h de exposición (**Tabla 3**), lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo sobre el contenido celular de clorofila *a* (**Fig 4.A y 4.B**), pero de nuevo vuelven a ser contrarios a los obtenidos por Majewska *et al.*, (2018), quienes observaron una reducción significativa de la autofluorescencia en los cultivos expuestos a DF con respecto al control. Otros estudios también observaron una reducción significativa de la fluorescencia de la clorofila *a* debido a la exposición de microalgas a otros fármacos, como el ibuprofeno (Prado *et al.*, 2015) o la eritromicina (Sendra *et al.*, 2018). En el caso de *P. tricornutum*, a pesar de que en el análisis del contenido celular de clorofila *a* no se observaron diferencias significativas (**Fig. 4.C**), el análisis de la autofluorescencia sí mostró una reducción significativa a concentraciones de 100 y 150 mg L⁻¹ de DF (**Tabla 4**). En base a estos resultados y teniendo en cuenta que, la fluorescencia de la clorofila *a* está influida por el contenido celular del pigmento (Franklin *et al.*, 2001), la reducción observada de la autofluorescencia, no puede explicarse, en este caso, por una disminución en el contenido celular de clorofila *a*.

La fluorescencia de la clorofila *a* también está relacionada con la actividad fotoquímica del PSII (Franklin *et al.*, 2001) ya que es el componente del aparato fotosintético donde se genera la mayor parte de la emisión *in vivo* de esta. Por tanto, cualquier daño que se produzca en dicho fotosistema, provocará un descenso de la emisión de fluorescencia (Prado, 2010). En base a esto y a los resultados obtenidos, el DF podría provocar un efecto inhibitorio en la actividad del PSII de *P. tricornutum* a partir de concentraciones de 100 mg L⁻¹. La influencia o modo de acción del DF sobre el aparato fotosintético todavía no está claro, pero se cree que puede influir directamente sobre los centros de reacción del PSII mediante una disrupción en la homeostasis del calcio, compuesto esencial para el funcionamiento de este fotosistema, provocando así la inhibición de la fotosíntesis mediante el silenciamiento de una fracción de los centros de reacción del PSII (Majewska *et al.*, 2018). Esta teoría podría explicar la disminución de la eficiencia fotosintética observada en ambas especies. Esta reducción del rendimiento fotosintético podría a su vez potenciar la producción de ROS en las células microalgales causando daños oxidativos y anomalías funcionales (Liu *et al.*, 2012) como por ejemplo, un daño oxidativo a nivel del

PSII o una descomposición oxidativa de la clorofila (Seoane, 2018), lo que podría explicar también el descenso de autofluorescencia detectado en *P. tricornutum*.

La exposición de las células microalgales a agentes contaminantes también puede inducir alteraciones en la morfología celular, como por ejemplo en el volumen o en la forma de las células, y en la complejidad intracelular.

Estudios previos con otros contaminantes del tipo PPCPs mostraron diferencias en el **tamaño**, tanto un aumento como una disminución, dependiendo del contaminante y las microalgas ensayadas (Seoane *et al.*, 2014; Seoane *et al.*, 2017b; Sendra *et al.*, 2018) y que generalmente, están relacionadas con alteraciones en el proceso de división celular (Prado, 2010; Seoane, 2018); sin embargo, en este trabajo no se observaron cambios significativos en ninguna de las dos especies (**Tablas 3 y 4**).

En cuanto a la **complejidad celular**, *C. reinhardtii* no mostró diferencias significativas entre los cultivos expuestos a DF y el control (**Tabla 3**); sin embargo, *P. tricornutum* si sufrió una disminución significativa a partir de 100 mg L⁻¹ de DF que se mantuvo en las concentraciones más altas (**Tabla 4**). En otros estudios, esta disminución de la complejidad a concentraciones altas de DF se ha considerado un indicio de la mortalidad de las células (Prado, 2010), sin embargo, los resultados del presente estudio mostraron una viabilidad de las células de casi el 100% (**Tablas 5 y 6**).

Los bioensayos de toxicidad basados en la inhibición del crecimiento microalgal tienen como inconveniente la incapacidad para distinguir entre células vivas y muertas (Nancharaiah *et al.*, 2007). Uno de los métodos desarrollados para solventarlo es la evaluación de la viabilidad celular mediante el análisis de la integridad estructural de la membrana plasmática celular. Para ello, el método más utilizado es el uso de FCM en combinación con fluorocromos (Seoane, 2018).

La **viabilidad celular** o **integridad de la membrana plasmática**, tanto de los cultivos de *C. reinhardtii*, como los de *P. tricornutum*, no se vio afectada significativamente por la exposición a DF, permaneciendo cerca del 100% para todas las concentraciones ensayadas (**Tablas 5 y 6**). En otro estudio ecotoxicológico observaron que las células de la microalga marina *Tetraselmis suecica* expuestas a algunos PPCPs también se mantuvieron viables, y reportaron que este mantenimiento de la viabilidad puede deberse a posibles ajustes metabólicos, mecanismos de defensa antioxidantes o sistemas de detoxificación (Seoane *et*

al., 2017b). Sin embargo, también hay estudios en los que se observó mortalidad celular por exposición a diferentes contaminantes, como el de González-Pleiter *et al.*, (2017) en el que observaron que, células de *C. reinhardtii* expuestas al triclosán, otro PPCP, sufrieron una pérdida significativa de su viabilidad celular. En el caso de *P. tricornutum*, como ya se indicó anteriormente, no se pudo llevar a cabo el análisis por FDA porque la tinción de las células fue muy irregular. En otros estudios la tinción con FDA tampoco funcionó bien con esta especie (Garvey *et al.*, 2007; Agustí & Sánchez, 2002) y las razones siguen sin estar claras.

El FDA también se utiliza para estudiar la **actividad esterasa inespecífica** como medida de la actividad metabólica *in vivo* de las células microalgales, dado que son enzimas esenciales para el funcionamiento normal de la célula (Jochem, 2000; Franklin *et al.*, 2001; Esperanza, 2017; Seoane, 2018). Los resultados obtenidos, tanto a través de los valores medios de la fluorescencia producida por el FDA (**Fig. 5**), como a través del análisis *in fluxo* (**Fig. 6**), mostraron un efecto negativo del DF sobre la actividad esterasa inespecífica de *C. reinhardtii* a las 24 y a las 96 h de exposición. Este efecto mostró ser dependiente de la concentración, de forma que, a mayor concentración de DF mayor fue la inhibición de la actividad esterasa, pero también fue dependiente del tiempo, ya que a las 96 h el efecto inhibitorio fue mucho más acusado. Estudios previos mostraron una reducción de la actividad esterasa en una microalga marina expuesta a antibióticos y algunos productos de higiene personal (Seoane *et al.*, 2014; Seoane *et al.*, 2017b). Prado *et al.*, (2015), también observaron una reducción significativa de la actividad esterasa por el efecto del ibuprofeno en las microalgas *Chlamydomonas moewusii* y *Chlorella vulgaris*; sin embargo, a diferencia de nuestros resultados, observaron que con el tiempo se producía una leve recuperación a las concentraciones más bajas. El descenso en la actividad esterasa observado en este trabajo, puede estar causado por alteraciones producidas en la propia enzima debido a una superproducción de ROS (Esperanza, 2017) o por cambios en el pH intracelular (Liu *et al.*, 2012).

El **pH intracelular (pHi)** juega un papel importante en las actividades metabólicas de las células, y su mantenimiento dentro de unos límites concretos, es fundamental para la viabilidad celular, ya que proporciona el entorno adecuado para la amplia gama de actividades que tienen lugar dentro de las células (Franck *et al.*, 1996). En este trabajo, el pHi no mostró diferencias significativas en *C. reinhardtii*. Sin embargo, las células de *P. tricornutum* sufrieron un aumento significativo del pHi a partir de 125 mg L⁻¹ de DF y se

hizo más acusado con el aumento de la concentración del contaminante (**Fig. 7**). Un aumento del pH_i también fue observado por Liu *et al.*, (2012) en otra diatomea marina por la exposición a un antibiótico, e indicaron que los cambios que se producen en el pH_i, ya sea un aumento o una disminución, pueden afectar a la actividad de enzimas claves y rutas metabólicas, incluyendo la fotosíntesis. Esto podría explicar algunos de los efectos observados en *P. tricornutum*, como pueden ser la disminución de la eficiencia fotosintética y de la fluorescencia de la clorofila *a*, o la reducción en la actividad esterasa. Además, los cambios de pH también parecen ser importantes en el control del ciclo celular y la capacidad de proliferación de las células (Madshus, 1988; Liu *et al.*, 2012) lo cual podría estar relacionado con la inhibición del crecimiento que hemos observado.

El **potencial de membrana citoplasmático** es una medida que ha demostrado ser útil en el análisis del estrés celular en diferentes microalgas (Seoane, 2018), ya que está involucrado en actividades celulares importantes, como puede ser la transformación de energía o la captación de nutrientes (Epps *et al.*, 1994). El DF no indujo la despolarización de las membranas de *C. reinhardtii* (**Fig. 8.A**); en cambio, *P. tricornutum* mostró un aumento progresivo de la fluorescencia de DiBAC₄(3) dependiente de la concentración de DF, que se hizo significativo a la mayor concentración ensayada (**Fig 8.B**), lo cual, refleja una tendencia a que las células sufran una despolarización de sus membranas conforme aumenta la concentración de DF a la que están expuestas. Algunos estudios relacionan el potencial de membrana con la viabilidad celular, ya que se ha observado que el daño producido en las membranas citoplasmáticas, empieza con cambios en las propiedades de la permeabilidad antes de producirse la interrupción de la integridad de la membrana (Jepras *et al.*, 1995; Prado *et al.*, 2015). Sin embargo, otros estudios señalan que las células que han sufrido alteraciones en el potencial de membrana no tienen que ser, necesariamente, no viables (Seoane *et al.*, 2017b), algo que también hemos podido observar en este estudio, en el que la viabilidad se mantuvo por encima del 94% de las células analizadas (**Tablas 5 y 6**). Por otro lado, la despolarización de la membrana citoplasmática puede estar relacionada con el incremento que hemos observado del pH_i, ya que la alcalinización del citosol puede inhibir la actividad de enzimas implicadas en el mantenimiento del potencial de membrana (Prado, 2010).

Finalmente, el **estrés oxidativo** es un parámetro importante debido a que un incremento en la producción de ROS por la exposición a contaminantes emergentes, ha mostrado estar implicada en muchos de los cambios morfológicos y fisiológicos que tienen lugar en las

células microalgales (Esperanza 2017; Seoane, 2018), y que, finalmente, pueden llegar a conducir a pérdidas en la integridad de la membrana, despolarización de membranas e inhibición de la fotosíntesis (González-Pleiter *et al.*, (2017). Los resultados obtenidos muestran que la exposición a DF durante 24 h provocó sólo un ligero aumento, no significativo, de la fluorescencia de DHR 123 en ambas especies, es decir, un aumento intracelular de H₂O₂ (Fig. 9). Este ligero aumento podría estar relacionado con los cambios de actividad esterasa observados para *C. reinhardtii*, así como con las alteraciones del metabolismo fotosintético o el cambio de pHi de las células de *P. tricornutum* expuestas a DF, como ya se indicó anteriormente.

La diferente sensibilidad de las dos especies utilizadas en este estudio ante la exposición a DF, a pesar de que las concentraciones ensayadas y las condiciones en las que se mantienen los cultivos sean las mismas, puede deberse a que son especies muy diferentes, que habitan ambientes muy distintos; *C. reinhardtii* es una microalga verde de agua dulce y *P. tricornutum* es una diatomea marina. Las diferentes adaptaciones fisiológicas encontradas en organismos marinos y dulceacuícolas, por ejemplo, con respecto a la osmorregulación (Sverdrup *et al.*, 2001) podrían explicar las diferencias observadas en la sensibilidad de las dos especies. Además, sus diferencias taxonómicas implican una importante diversidad morfológica, por ejemplo, en cuanto a su pared celular, lo que puede dar lugar a variaciones en la adsorción o ingestión del contaminante (Ferrari *et al.*, 2003; Berrebaan *et al.*, 2017). En cuanto al volumen celular, *P. tricornutum* es una especie mucho menor que *C. reinhardtii*, por lo que, aunque las concentraciones utilizadas sean las mismas y, por tanto, la cuota celular de contaminante sea la misma (0,75 ng de DF por célula a la mayor concentración ensayada), las células de *P. tricornutum*, al ser más pequeñas, tendrían más carga de contaminante por peso seco, lo que también podría explicar su mayor sensibilidad hacia el DF. Otros estudios ya habían visto diferencias en la sensibilidad de especies distintas expuestas al mismo contaminante, como Pavlić *et al.*, (2005,) quienes observaron que diatomeas marinas fueron significativamente más sensibles a contaminantes del tipo PPCPs que las algas verdes de agua dulce.

6. CONCLUSIONES

1. El anti-inflamatorio no esteroideo diclofenaco es un potencial agente tóxico para los microorganismos acuáticos, ya que provocó alteraciones fisiológicas significativas sobre las células de *Chlamydomonas reinhardtii* y de *Phaeodactylum tricorutum*, a pesar de que la viabilidad celular se mantuvo durante todo el ensayo.

2. La diatomea marina *Phaeodactylum tricorutum* resultó ser mucho más sensible al diclofenaco, llegando incluso a producirse una inhibición completa de su crecimiento a las concentraciones más altas ensayadas. La diferente sensibilidad de ambas especies ante el diclofenaco puede deberse a sus diferencias taxonómicas y a que habitan ambientes muy distintos.

3. En el caso de *Chlamydomonas reinhardtii*, los únicos parámetros que se han visto afectados por la presencia de diclofenaco fueron la eficiencia fotosintética y la actividad esterasa inespecífica. Si bien esta medida de la actividad metabólica no pudo ser analizada en *Phaeodactylum tricorutum*, la mayoría de los restantes parámetros analizados en esta diatomea se vieron afectados, en mayor o menor medida, por la presencia de diclofenaco en el medio. Por otro lado, la eficiencia fotosintética fue el único parámetro que se vio afectado en ambas especies a las 24 horas de exposición, por lo que se debería tener en cuenta como un posible indicador o biomarcador de la toxicidad del diclofenaco.

4. Ante la heterogeneidad de los resultados obtenidos, parece necesario realizar experimentos adicionales para confirmar la toxicidad del diclofenaco sobre los organismos acuáticos y su modo de acción. Por otro lado, dado que el diclofenaco es una sustancia biológicamente activa, y se descarga continuamente en medios acuáticos a través de efluentes a bajas concentraciones, sería conveniente realizar estudios de toxicidad a más largo plazo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agustí, S., Sánchez, MC. (2002). Cell viability in natural phyto-plankton communities quantified by a membrane permeability probe. *Limnol Oceanogr.* 47(3): 818–828
- Araniti, F., de la Peña, TC., Sánchez-Moreiras, AM. (2018). Flow Cytometric Measurement of Different Physiological Parameters. En: Sánchez-Moreiras, AM., Reigosa, MJ. (Eds.). *Advances in Plant Ecophysiology Techniques*. Cham: Springer, pp. 195-213.
- aus der Beek, T., Weber, FA., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A. (2016). Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. *Environ Toxicol Chem.* 35(4): 823-835.
- Berrebaan, I., Montassir, L., Said, B., Mustapha, E., Bessi, H. (2017). Evaluation of Ecotoxicity of Ibuprofen and Paracetamol on the Freshwater Green Microalgae “*Pseudokirchneriella Subcapitata*”. *Eng Technol J.* 2(11): 303-309.
- Bonnefille, B., Gomez, E., Courant, F., Escande, A., Fenet, H. (2018). Diclofenac in the marine environment: a review of its occurrence and effects. *Mar Pollut Bull.* 131: 496-506.
- Bold, H., Wynne, M. (1985). *Introduction to the algae: structure and reproduction*. New Jersey: Prentice-Hall.
- Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, MP., Saoncella, A. (2001). An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Res.* 35(1): 69-76.
- Cid, A., Prado, R., Rioboo, C., Suarez-Bregua, P., Herrero, C. (2012). Use of Microalgae as Biological Indicators of Pollution: Looking for New Relevant Cytotoxicity Endpoints. En: Johnsen, MN. (ed.). *Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy*. New York: Nova Science Publishers, pp: 311-323.
- Claessens, M., Vanhaecke, L., Wille, K., Janssen, CR. (2013). Emerging contaminants in Belgian marine waters: single toxicant and mixture risks of pharmaceuticals. *Mar Pollut Bull.* 71(1-2): 41-50.
- Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol Lett.* 142(3): 185-194.
- Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol Environ Saf.* 59(3): 309-315.
- Crowley, LC., Scott, AP., Marfell, BJ., Boughaba, JA., Chojnowski, G., Waterhouse, NJ. (2016). Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 7: 647-651.
- Ding, T., Yang, M., Zhang, J., Yang, B., Lin, K., Li, J., Gan, J. (2017). Toxicity, degradation and metabolic fate of ibuprofen on freshwater diatom *Navicula* sp. *J Hazard Mater.* 330: 127-134.
- Directiva 2008/105/CE. relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea*, nº L 348/84, (24 de diciembre de 2008).
- 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. *Diario Oficial de la Unión Europea*, nº L 226/1, (12 de agosto de 2013).
- Ebele, AJ., Abdallah, MAE., Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerg Contam.* 3(1): 1-16.
- Epps, DE., Wolfe, ML., Groppi, V. (1994). Characterisation of the steady-state and dynamic fluorescent properties of the potential-sensitive dye bis-(1,3-dibutyl barbituric acid) trimethine oxonol (DiBAC4(3)) in model systems and cells. *Chem Phys Lipids.* 69(2):137-150.
- Esperanza, M. Toxicidad ejercida por contaminantes acuáticos sobre microalgas de agua dulce [tesis doctoral]. Universidade da Coruña; 2017.
- Esperanza, M., Cid, Á., Herrero, C., Rioboo, C. (2015). Acute effects of a prooxidant herbicide on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: Screening cytotoxicity and genotoxicity endpoints. *Aquat Toxicol.* 165: 210-221.
- Esperanza, M., Houde, M., Seoane, M., Cid, Á., Rioboo, C. (2017). Does a short-term exposure to atrazine provoke cellular senescence in *Chlamydomonas reinhardtii*?. *Aquat Toxicol.* 189: 184-193.
- 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: 237-245.
- Ferrari, B., Paxeus, N., Giudice, RL., Pollio, A., Garric, J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicol Environ Saf.* 55(3): 359-370.

- 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(3): 187-195.
- Franklin, NM., Stauber, JL., Lim, RP. (2001). Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environ Toxicol Chem.* 20(1): 160-170.
- Franqueira, D., Orosa, M., Torres, E., Herrero, C., Cid, A. (2000). Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. *Sci Total Environ.* 247(2-3): 119-126.
- Garvey, M., Moriceau, B., Passow, U. (2007). Applicability of the FDA assay to determine the viability of marine phytoplankton under different environmental conditions. *Mar Ecol Prog Ser.* 352: 17-26.
- 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.
- Gorman, DS., Levine, RP. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci.* 54(6): 1665-1669.
- Han, J., Burgess, K. (2010). Fluorescent indicators for intracellular pH. *Chem Rev.* 110(5): 2709-2728.
- Harris, EH. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu Rev Plant Biol.* 52(1): 363-406.
- Harris, EH. (2009). *The Chlamydomonas Sourcebook*. Oxford: Academic Press.
- He, BS., Wang, J., Liu, J., Hu, XM. (2017). Eco-pharmacovigilance of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Necessity and opportunities. *Chemosphere.* 181: 178-189.
- 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(2): 99-110.
- Jeanneret, R., Contino, M., Polin, M. (2016). A brief introduction to the model microswimmer *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur Phys J Spec Top.* 225(11-12): 2141-2156.
- Jeffrey, SW., Humphrey, GF. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanz.* 167(2): 191-194.
- Jepras, RI., Carter, J., Pearson, SC., Paul, FE., Wilkinson, MJ. (1995). Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 61(7): 2696-2701.
- Jochem, FJ., 2000. Probing the physiological state of phytoplankton at the single level. *Sci. Mar.* 64(2): 183-195.
- Kiani-Esfahani, A., Tavalae, M., Deemeh, MR., Hamiditabar, M., Nasr-Esfahani, MH. (2012). DHR123: an alternative probe for assessment of ROS in human spermatozoa. *Syst Biol Reprod Med.* 58(3): 168-174.
- Lanas, A. (2016). *NSAIDs and Aspirin*. Switzerland: Springer.
- Listwan, S., Tokarek, W., Kleszcz, K., Chowaniec, M., Porębska, Z., Krawczyk, K., Bojko, M. Latowski, D. *Phaeodactylum Tricornutum* as a Potential Phytoindicator of Sea and Fresh Waters. En: Proceedings of the 4th World Congress on New Technologies (NewTech'18). Madrid: 2018. p.147-1-147-5
- 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.
- Lonappan, L., Brar, SK., Das, RK., Verma, M., Surampalli, RY. (2016). Diclofenac and its transformation products: environmental occurrence and toxicity-a review. *Environ Int.* 96: 127-138.
- Madhus, IH., 1988. Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem J.* 250(1): 1-8.
- Majewska, M., Harshkova, D., Guściora, M., Aksmann, A. (2018). Phytotoxic activity of diclofenac: Evaluation using a model green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with atrazine as a reference substance. *Chemosphere.* 209: 989-997.
- Martin-Jézéquel, V., Tesson, B. (2012). *Phaeodactylum tricornutum* polymorfism: an overview. En: Heimann, K., Katsaros, C. (Eds.). *Advances in algal cell biology*. Berlin: Walter de Gruyter, pp. 43-82.
- Martino, AD., Meichenin, A., Shi, J., Pan, K., Bowler, C. (2007). Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions. *J Phycol.* 43(5): 992-1009.
- Maxwell, K., Johnson, GN. (2000) Chlorophyll fluorescence. A practical guide. *J Exp Bot.* 51(345): 659-668.
- Moro, I., Matozzo, V., Piovan, A., Moschin, E., Dalla Vecchia, F. (2014). Morpho-physiological effects of ibuprofen on *Scenedesmus rubescens*. *Environ Toxicol Pharmacol.* 38(2): 379-387.
- Musgrove, E., Rugg, C., Hedley, D., (1986). Flow cytometric measurement of cytoplasmic pH: a critical evaluation of available fluorochromes. *Cytometry.* 7(4): 347-355.

- Nancharaiah, YW., Rajadurai, M., Venugopalan, VP. (2007). Single cell level microalgal ecotoxicity assessment by confocal microscopy and digital image analysis. *Environ Sci Technol.* 41(7), 2617-2621.
- O'Connor, JE., Herrera, G., Sala-de-Oyanguren, F., Jávega, B., Martínez-Romero, A. (2017). Cytomics of Oxidative Stress: Probes and Problems. En: Robinson, JP., Cossarizza, A. (Eds.). *Single Cell Analysis*. Singapore: Springer, pp. 83-118.
- Ormerod, MG. (2008). *Flow cytometry: a basic introduction*. Surrey, UK: Lulu Inc.
- Pavlić, Ž., Vidaković-Cifrek, Ž., Puntarić, D. (2005). Toxicity of surfactants to green microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Scenedesmus subspicatus* and to marine diatoms *Phaeodactylum tricorutum* and *Skeletonema costatum*. *Chemosphere.* 61(8): 1061-1068.
- Petrović, M., González, S., Barceló, D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends Analyt Chem.* 22(10): 685-696.
- Pino, MR., Muñiz, S., Val, J., Navarro, E. (2016). Phytotoxicity of 15 common pharmaceuticals on the germination of *Lactuca sativa* and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ Sci Pollut Res.* 23(22): 22530-22541.
- Prado, R. Citotoxicidad ejercida por el herbicida bipiridílico paraquat sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas moewusii* Gerloff [tesis doctoral]. Universidade da Coruña; 2010.
- 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(2): 240-247.
- 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.
- Protisten.de [Internet]. Alemania: Wolfgang Bettighofer; 2011 [actualizado el 4 de mayo de 2018; acceso el 30 de enero de 2019]. Disponible en: http://www.protisten.de/german/gallery_main/gallery_main.html
- Rodríguez-Narváez, OM., Peralta-Hernandez, JM., Goonetilleke, A., Bandala, ER. (2017). Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. *Chem Eng J.* 323: 361-380.
- Sendra, M., Moreno-Garrido, I., Blasco, J., Araújo, CV. (2018). Effect of erythromycin and modulating effect of CeO₂ NPs on the toxicity exerted by the antibiotic on the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Phaeodactylum tricorutum*. *Environ Pollut.* 242: 357-366.
- Seoane, M. Efecto tóxico de microcontaminantes acuáticos emergentes sobre microalgas marinas mediante el análisis de biomarcadores de citotoxicidad [tesis doctoral]. Universidade da Coruña; 2018.
- Seoane, M., Esperanza, M., Cid, Á. (2017a). Cytotoxic effects of the proton pump inhibitor omeprazole on the non-target marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Aquat Toxicol.* 191: 62-72.
- Seoane, M., Esperanza, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. (2017b). Flow cytometric assay to assess short-term effects of personal care products on the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Chemosphere.* 171: 339-347.
- 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.
- Shapiro, HM. (1995). *Practical Flow Cytometry*. New York: Willey-Lyss Inc.
- Sharma, K., Kaushik, G. (2017). NSAIDS in the Environment: From Emerging Problem to Green Solution. *Ann Pharmacol Pharm.* 2(14): 1-3.
- Sjollema, SB., van Beusekom, SA., van der Geest, HG., Booij, P., de Zwart, D., Vethaak, AD., Admiraal, W. (2014). Laboratory algal bioassays using PAM fluorometry: effects of test conditions on the determination of herbicide and field sample toxicity. *Environ Toxicol Chem.* 33(5): 1017-1022.
- Strickland, JD., Parsons, TR. (1972). *A practical handbook of seawater analysis*. J Fish Res Board Can. 167: 201-203.
- Sverdrup, LE., Källqvist, T., Kelley, AE., Fürst, CS., Hagen, SB. (2001). Comparative toxicity of acrylic acid to marine and freshwater microalgae and the significance for environmental effects assessments. *Chemosphere.* 45(4-5): 653-658.
- Torres, E., Cid, A., Herrero, C., Abalde, J., 2000. Effect of cadmium on growth, ATP content, carbon fixation and ultrastructure in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin. *Water Air Soil Pollut.* 117(1-4): 1-14.
- Wang, L., Zheng, B. (2008). Toxic effects of fluoranthene and copper on marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *J Environ Sci.* 20(11): 1363-1372.

ANEXO I. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

➤ Composición del medio de cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*:

Macronutrientes:

NH ₄ Cl	10 g L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4 g L ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2 g L ⁻¹

Solución de fosfatos:

K ₂ HPO ₄	288 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	144 g L ⁻¹

Oligoelementos:

Tiamina	35 µg L ⁻¹
Biotina	5 µg L ⁻¹
Vitamina B ₁₂	3 µg L ⁻¹
Citrato férrico	20 µM
ZnCl ₂	1 µM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1 µM
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1 µM
CoCl ₂	0,1 µM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,1 µM

➤ Composición del medio de cultivo de *Phaeodactylum tricornutum*:

Macronutrientes:

NaNO ₃	340,00 mg L ⁻¹
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	31,20 mg L ⁻¹
Na ₂ SiO ₃	30,50 mg L ⁻¹

Oligoelementos:

Citrato férrico	5,00 mg L ⁻¹
ZnCl ₂	0,14 mg L ⁻¹
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,20 mg L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,24 mg L ⁻¹
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,02 mg L ⁻¹
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025 mg L ⁻¹

Vitaminas:

Tiamina (B1)	0,035 mg L ⁻¹
Cianocobalamina (B12)	0,003 mg L ⁻¹
Biotina (B7)	0,005 mg L ⁻¹