

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Toxicidade de contaminantes emerxentes sobre microorganismos: estudo da concentración inhibitoria mínima

Toxicidad de contaminantes emergentes sobre microorganismos: estudio de la concentración inhibitoria mínima

Toxicity of emerging pollutants on microorganisms: minimum inhibitory concentration study

Evelyn Montes De Oca Méndez

Septiembre, 2019

El presente Trabajo de Fin de Grado ha sido realizado en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología de la Universidad de la Coruña, bajo la dirección de la Dra. Carmen Rioboo Blanco, Profesora Contratada Doctora de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la Coruña.

Agradecimientos

Me gustaría agradecerle a la Dra. Carmen Rioboo Blanco su apoyo incondicional en todo momento, no solo entendiendo, sino también animándome en aquellas decisiones que he ido tomando a lo largo de estos meses. No solo destaca como profesional, sino como persona, por su empatía, gratitud y cariño.

Gracias Carmen, de corazón, por enseñarme en tantos aspectos.

“Uno recuerda con aprecio a sus maestros brillantes, pero con gratitud a aquellos que tocaron nuestros sentimientos”. Carl Gustav Jung

Por otro lado, me gustaría agradecer a todo el personal del laboratorio de Microbiología ya que siempre me han ayudado con mucha amabilidad en todo lo que he necesitado.

Y, por último, y no por ello menos importante, a mis padres. No hay palabras suficientes para agradecerlos todo el esfuerzo que habéis realizado durante todos estos años para ayudarme a conseguir mis objetivos. Solo vosotros lo sabéis, este triunfo es más vuestro que mío.

ÍNDICE

<i>RESUMEN/RESUMO/SUMMARY</i>	1
1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	9
3.1. Preparación de los cultivos de los microorganismos	9
3.2. Preparación de la solución stock de los contaminantes ensayados	10
3.3. Diseño experimental	10
4. RESULTADOS	11
5. DISCUSIÓN	13
6. CONCLUSIÓN/CONCLUSIÓN/CONCLUSION	15
7. BIBLIOGRAFÍA	16

RESUMEN/RESUMO/SUMMARY

RESUMEN

En el presente trabajo se ha estudiado el potencial efecto citotóxico de diferentes contaminantes emergentes sobre el crecimiento de tres especies de bacterias y una especie de levadura. El método seleccionado para este fin se caracteriza por ser sencillo tanto en cuanto a su realización como en cuanto a la interpretación de los resultados, puesto que el efecto tóxico de los contaminantes emergentes se ha evaluado en función de la aparición de puntos o *spots* formados por células sobre un medio de cultivo que serían un indicativo de la capacidad de crecimiento de los microorganismos. Los contaminantes emergentes objeto de estudio han sido seleccionados debido a que su frecuencia de uso y aplicación por el ser humano es muy elevada. Así se han incluido medicamentos, agentes antimicrobianos y otros productos que forman parte de utensilios de la vida diaria y el cuidado personal. Los resultados obtenidos han mostrado que la gran mayoría de los contaminantes emergentes ensayados ejercen un efecto citotóxico sobre los microorganismos seleccionados a las concentraciones testadas. Sin embargo, el nivel de toxicidad difiere en función de la especie de microorganismo ya que, a la vista de los valores de concentración mínima inhibitoria obtenidos para cada compuesto y especie, unos han demostrado ser más sensibles que otros. Teniendo en cuenta estos resultados junto con el elevado uso de estos compuestos, sería interesante realizar más estudios que profundicen en la potencial toxicidad de estos contaminantes emergentes sobre los organismos unicelulares.

PALABRAS CLAVE: *spot testing*, contaminantes emergentes, concentración mínima inhibitoria, microorganismos.

RESUMO

No presente traballo estúdase o potencial efecto citotóxico de diferentes contaminantes emerxentes sobre o crecemento de tres especies de bacterias e unha especie de levadura. O método seleccionado para este fin caracterízase por ser sinxelo tanto en canto a súa realización como en canto á interpretación dos resultados, posto que o efecto tóxico dos contaminantes emerxentes foi avaliado en función da aparición de puntos ou spots sobre

un medio de cultivo formado por células, as cales serían un indicativo da capacidade de crecemento dos microorganismos. Os contaminantes emerxentes obxeto de estudo foron seleccionados debido ó seu elevado uso e aplicación por parte do ser humano. Deste xeito incluíronse medicamentos, axentes antimicrobianos e outros produtos que forman parte de utensilios da vida diaria e o cuidado persoal. Os resultados obtidos mostraron que a meirande parte dos contaminantes emerxentes ensaiados exercen un efecto citotóxico sobre os microorganismos seleccionados ás concentracións testadas. Sen embargo, o nivel de toxicidade difire en función da especie de microorganismo xa que, á vista dos valores de concentración mínima inhibitoria obtidos para cada composto e especie, uns demostraron ser máis sensibles ca outros. Tendo en conta estes resultados xunto co elevado uso destas substancias, sería interesante realizar máis estudos os cales profundan na potencial toxicidade destes contaminantes sobre os organismos unicelulares.

PALABRAS CRAVE: *spot testing*, contaminantes emerxentes, concentración mínima inhibitoria, microorganismos

SUMMARY

The present work examines the potential cytotoxic effect of different emerging pollutants on the growth of three species of bacteria and one species of yeast. The method selected for this purpose is characterized by being simple both in terms of its performance and in terms of the interpretation of the results. Therefore, the toxic effect of emerging pollutants has been evaluated based on the appearance of points or spots on a culture medium formed by cells that would be indicative of the growth capacity of microorganisms. The emerging pollutants under study have been selected because their frequency of use and application by humans is very high. This includes medications, antimicrobial agents and other products that are part of everyday life and personal care utensils. The results obtained have shown that the vast majority of emerging contaminants tested causes a cytotoxic effect on the selected microorganisms at the concentrations tested. However, the level of toxicity differs depending on the species of microorganism because, in view of the minimum inhibitory concentration values obtained for each compound and species, some have proven to be more sensitive than others. Considering these results along with the high use of these compounds, it would be interesting to conduct further studies that could

give us more information about the potential toxicity of these emerging pollutants on unicellular organisms.

KEYWORDS: *spot testing, emergent pollutants*, minimum biocidal concentration, microorganisms.

1. INTRODUCCIÓN

El término contaminante emergente hace referencia a un grupo de sustancias heterogéneas cuyo origen, así como composición, es muy variable (1). Estos compuestos son conocidos también bajo el nombre de nuevos contaminantes debido a que, aunque su presencia en el medio ambiente no es algo novedoso, sí que lo son las consecuencias que pueden acarrear tanto a nivel ecológico como a nivel de la salud y la seguridad humana (1,2). Entre ellos se encuentran productos que son usados a diario tales como productos farmacéuticos, de cuidado personal o cosmética y aquellos empleados para el crecimiento y la salud de los animales (3). La peculiaridad de este grupo de contaminantes es que no necesitan persistir en el medio ambiente para llegar a causar efectos negativos, ya que su tasa de transformación/eliminación es directamente compensada con su introducción continua en el medio ambiente (4).

Si bien estos contaminantes no están actualmente regulados bajo una ley la cual determine las máximas concentraciones admisibles, durante los últimos años se han llevado a cabo numerosas investigaciones donde se ha demostrado que se encuentran en entornos acuáticos tales como ríos, arroyos y aguas subterráneas, reconociéndose, así como sustancias peligrosas de las cuales es necesario tener un mayor control, y que por ello deberían de estar incluidas en la legislación (2,3). Como ya se comentó, la presencia de los contaminantes emergentes en los medios acuáticos es debido el amplio uso que de estos se hace actualmente, puesto que se emplean tanto en animales como en humanos y a escala mundial. Además, gran parte de estos compuestos, entre ellos los fármacos, no consiguen eliminarse por completo y es a través de los productos de excreción del organismo que los consume como pasan al medio acuático y/o terrestre (5).

El presente trabajo se ha centrado en seis contaminantes emergentes comúnmente empleados en la actualidad:

Ibuprofeno es el nombre comercial que recibe el ácido 2 - (4 - isobutilfenil) propanoico (Fig.1). Es un medicamento antiinflamatorio no esteroideo ampliamente utilizado como analgésico, antirreumático y antipirético (5). Se localiza esencialmente en aguas residuales, ríos y lagos de Europa. Algo a destacar del mismo es que se trata de un

contaminante persistente con tendencia a bioacumularse por lo que podría generar efectos perjudiciales (5).

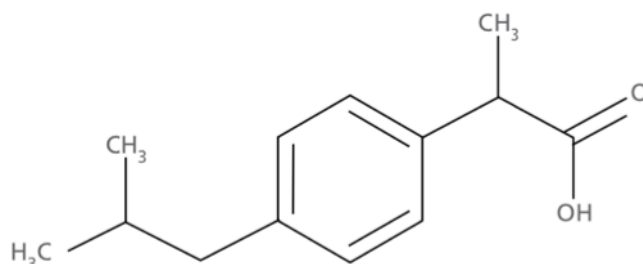


Figura 1. Estructura química del ácido 2 - (4 - isobutilfenil) propanoico (6)

El ácido acetilsalicílico es el principio activo del medicamento conocido comercialmente como aspirina (Fig 2.). Este medicamento, mundialmente conocido, pertenece también a la familia de los antiinflamatorios no esteroideos y se emplea comúnmente para el tratamiento antipirético (7).

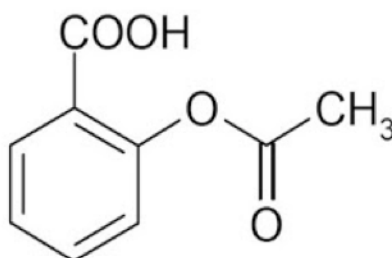


Figura 2. Estructura química del ácido acetilsalicílico (3)

El diclorofenaco, al igual que en los dos citados anteriormente, es un medicamento que se encuadra dentro de los antiinflamatorios no esteroideos que se emplea para reducir la inflamación, el dolor y la fiebre. Se trata de un derivado fenilacético (Fig.3) caracterizado por su elevada tasa de consumo, tratándose así de uno de los fármacos más empleado a nivel mundial. Dicha característica sumada al hecho de que presenta una baja degradación provoca que sean fácilmente detectables en elevadas concentraciones en ríos, sedimentos y agua potable (8).

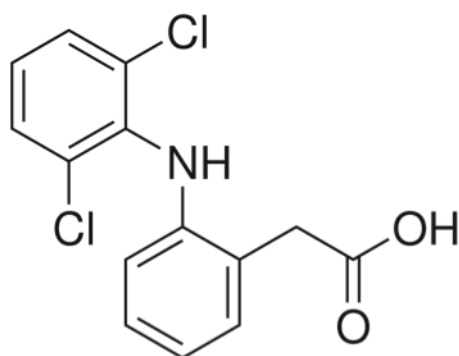


Figura 3. Estructura química del diclorofenaco (8)

El Ttriclosán se trata del 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol (Fig.4), un agente antimicrobiano de amplio espectro que se utiliza como principio activo en jabones antisépticos de uso hospitalario y en las últimas décadas se ha incorporado a numerosos productos de cuidado personales tales como desodorantes, geles y pastas dentífricas. También se puede localizar en residuos plásticos (9). 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol se ha detectado en ecosistemas acuáticos debido a su eliminación parcial en el tratamiento de las aguas residuales. Una propiedad de este contaminante emergente es su elevado potencial de bioacumulación, por lo que puede suponer una amenaza ambiental (10).

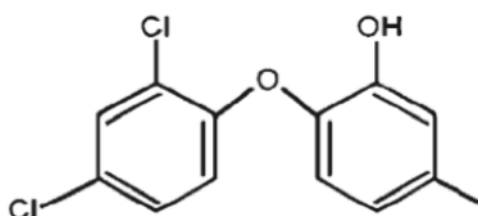


Figura 4. Estructura química del triclosán (10)

El florfenicol es un agente antibacteriano que se caracteriza por ser de amplio espectro. Pertenece a la familia de los fenicoles (Fig.5) que, desde un punto de vista químico es un derivado monofluorado del tianfenicol, un análogo del cloranfenicol que posee un rango de actividad similar (11).

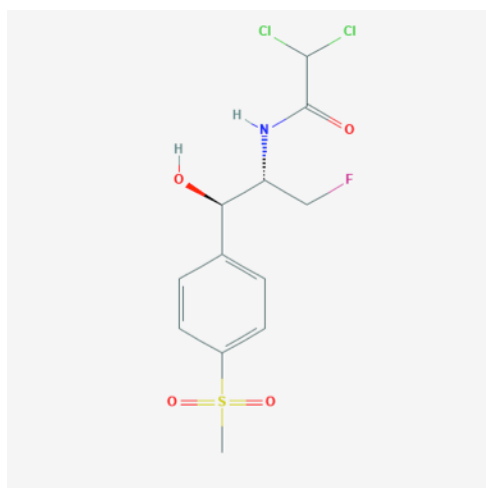


Figura 5. Estructura química del florfenicol (12)

Bisfenol A es el nombre común que recibe el 2,2-(4,4-dihidroxifenol) propano (Fig. 6). Este contaminante emergente es de uso muy común debido a que se emplea para la producción de policarbonato plástico, el cual tiene numerosas aplicaciones ya que se caracteriza por su gran resistencia térmica así como dureza. Por ello es muy común que forme parte de productos tales como papel térmico, plásticos de usos diarios tales como juguetes, entre otros e inclusive para cristales oculares (13).

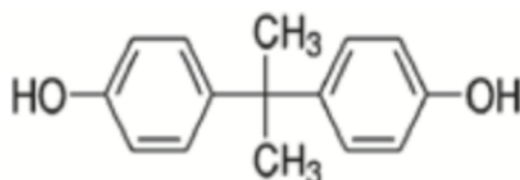


Figura 6. Estructura química del bisfenol -A (10)

En la actualidad, son numerosas las investigaciones que se están llevando a cabo para evaluar el nivel de peligrosidad para los ecosistemas acuáticos y la salud pública que pueden acarrear la acumulación de los diferentes grupos de contaminantes emergentes. Durante los últimos años, dichos estudios se han centrado fundamentalmente en caracterizar el potencial efecto dañino de estos compuestos sobre animales mamíferos. Sin embargo, recientemente se han comenzado a utilizar organismos que no estén bajo la protección de ninguna ley. Entre estos se incluyen bacterias, hongos, algas, plantas y

animales invertebrados (14). En el presente trabajo se han empleado microorganismos, ya que son considerados los primeros afectados por las descargas de distintos contaminantes en el ecosistema al estar en contacto directo con el medio, separados únicamente por una membrana o pared celular (15). Se eligieron microorganismos procariotas y eucariotas. Los microorganismos procariotas están representados por 3 especies bacterianas (*Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus* y *Serratia marcescens*) mientras que será *Saccharomyces cerevisiae* quien represente al dominio eucariota.

Los microorganismos del género *Bacillus* se encuadran dentro de la familia Bacillaceae. Se caracterizan por ser bacilos que pertenecen al grupo de bacterias Gram positivas. Tienen un amplio rango de tamaño y pueden ser aerobios estrictos o anaerobios facultativos. Otra característica a tener en cuenta es que son formadores de endosporas muy resistentes a condiciones extremadamente desfavorables (16).

Staphylococcus aureus pertenece a la familia Staphylococcaceae. Se caracterizan por ser bacterias Gram positivas con forma de coco e inmóviles. Presentan un tamaño de 0,5 a 1,5 μm estando agrupadas en forma de racimos de uva. Son bacterias anaerobias facultativas, que, en este caso, no forman esporas (17).

Serratia marcescens, con cepas que actúan como patógenos oportunistas, pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Es un bacilo Gram negativo, aerobio facultativo y móvil que se caracteriza principalmente por producir una serie de enzimas hidrolíticas que degradan compuestos de elevado peso molecular (18).

Saccharomyces cerevisiae es una levadura, un hongo unicelular, del grupo de los ascomicetos. Se caracteriza principalmente por obtener la energía a partir de la glucosa teniendo así una elevada capacidad fermentativa. Es un organismo eucariota muy conocido desde la antigüedad debido a su uso en la industria para la producción de pan y alcohol (19).

En el presente trabajo, se ha empleado un método de análisis basado en la inoculación en medios sólidos de “gotas” (*spot testing*) de cultivos microbianos expuestos previamente a diluciones seriadas de soluciones concentradas de los compuestos de estudio. Se trata de un método novedoso y muy visual, donde la formación o no de puntos o *spots* de

crecimiento microbiano puede utilizarse como un indicador de la toxicidad con el que, además, se podrá determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos ensayados. Ésta se considera la concentración más baja, expresada en mg/L, necesaria de una sustancia para inhibir el crecimiento de un microorganismo bajo condiciones específicas *in vitro* y en un período de tiempo establecido (20).

2. OBJETIVOS

A la vista de lo expuesto anteriormente, el objetivo principal de esta investigación es estudiar y comparar el potencial efecto citotóxico que ejercen seis contaminantes emergentes sobre cuatro especies de microorganismos con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria de los mismos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Preparación de los cultivos de los microorganismos

Para cada microorganismo ensayado, se prepararon cultivos puros líquidos a partir de colonias aisladas. Las cepas empleadas proceden de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), de la Universidad de Valencia. Para ello, trabajando siempre bajo condiciones de asepsia, los microorganismos fueron cultivados en tubos de ensayo de 10 ml con 3 ml de medio de cultivo. Para los microorganismos procariotas se empleó un medio de cultivo general, el caldo de triptona de soja (TSB; *Tryptic Soy Broth*). Posteriormente se incubaron en una estufa a 37° C durante 24 horas. Para *Saccharomyces cerevisiae*, se utilizó el medio complejo para el crecimiento de levaduras (YPD; *Yeast Extract Peptone Dextrose*)y, en este caso, el cultivo se mantuvo a 30°C y en un tiempo máximo de 48 horas. Todos los materiales empleados fueron previamente esterilizados en autoclave (Raypa).

Transcurridas las 24-48 horas de incubación correspondiente se procede a la medición de la transmitancia (Shimadzu) con el objetivo de trabajar siempre con una misma densidad

celular inicial. En todos los casos, los cultivos se diluyeron con tampón fosfato salino estéril para ajustar la transmitancia al 90% (Fig.7).

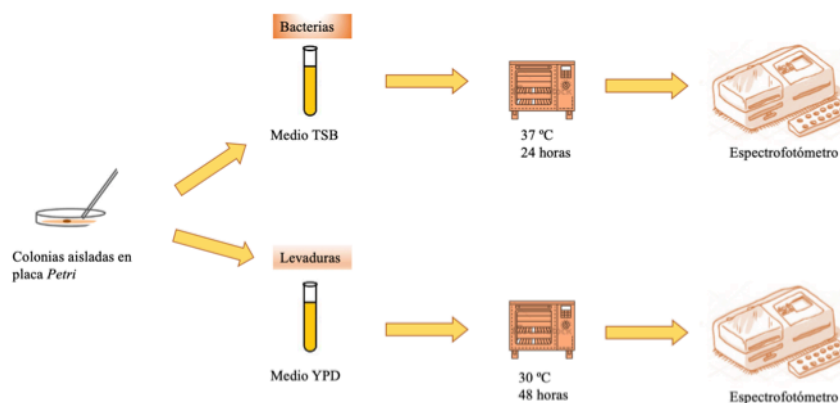


Figura 7. Preparación de los cultivos experimentales de microorganismos.

3.2. Preparación de la solución stock de los contaminantes ensayados

De cada uno de los contaminantes se preparó una solución *stock* a una concentración final de 2 mg/ml en tampón fosfato salino estéril. A continuación, se realizaron diluciones seriadas decimales hasta la dilución 10^{-5} con tampón fosfato salino para cada una de las soluciones *stock* de los contaminantes.

3.3. Diseño experimental

Para la realización del ensayo en primer lugar, se expusieron los distintos microorganismos a los seis contaminantes a estudiar, cuyas soluciones *stock* a las diferentes concentraciones ensayadas han sido preparadas tal y como se ha explicado en el punto anterior. Para ello se emplearon tubos eppendorf en los cuales se vertieron 150 μ l totales de los cuales la mitad se correspondieron al inóculo convenientemente diluido de los microorganismos y la otra mitad a las soluciones correspondientes a las concentraciones de los contaminantes emergentes ensayados. De este modo, las concentraciones finales ensayadas para cada compuesto fueron: 0,01, 0,1, 1, 10, 10^2 , 10^3 mg/L. En todos los casos se procedió también a la preparación de un control sin contaminante utilizando tampón fosfato salino. Posteriormente estos cultivos se llevaron

a las estufas correspondientes durante 24 horas a 37°C para las bacterias y 48 horas a 30°C para la levadura.

Pasado el tiempo de exposición, se pipetearon 3 μ l de cada suspensión celular, formando gotas o *spots* en placas Petri con dos medios diferentes: caldo de triptona de soja con agar (TSA; *Tryptic Soy Agar*) para las bacterias y el medio YPD con agar para la levadura. Estas placas se incubaron durante 24 y 48 horas a las respectivas temperaturas de 37°C y 30°C. La capacidad que presentan los microorganismos ensayados para crecer en estos medios de cultivo formado puntos o *spots*, es decir, que se produzca la formación de colonias confluyentes, se empleó como criterio para la valoración de la toxicidad y para la obtención de la concentración inhibitoria mínima para cada compuesto ensayado.

4. RESULTADOS

De los seis contaminantes emergentes objeto de estudio, tres de ellos se encuadran dentro del grupo de antiinflamatorios no esteroideos y han arrojado resultados muy diferentes.

En el caso del ibuprofeno, este fármaco no ha mostrado toxicidad sobre ninguno de los microorganismos ensayados, ya que en todos ellos se ha observado crecimiento incluso en las muestras tratadas con la concentración más elevada de este compuesto (Tabla 1).

El ácido acetilsalicílico sí ha inhibido el crecimiento de los microorganismos ensayados, si bien dicha inhibición se observa a las concentraciones más elevadas ensayadas (Tabla 1). De esta forma se ha podido establecer que la concentración mínima inhibitoria es la misma para todos los microorganismos utilizados en este estudio: 1000 mg/L.

Por otro lado, el efecto inhibitorio que ejerce el diclorofenaco ha sido diferente en función del microorganismo testado (Tabla 1). Así se observa que para *Staphylococcus aureus*, la CMI se sitúa en 100 mg/L. La concentración inhibitoria mínima es mayor en el caso de *Serratia marcescens* y *Saccharomyces cerevisiae* dado que se encuentra en el orden de 10³ mg/L. Sin embargo, en *Bacillus sp* no provoca ningún efecto citotóxico puesto que se

ha producido la formación de *spots* tras la exposición a cada una de las concentraciones crecientes probadas de diclorofenaco.

No se ha observado que bisfenol A ejerza un efecto citotóxico sobre *Bacillus sp*, *Serratia marcescens* o *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, presenta una notable citotoxicidad sobre *Staphylococcus aureus*, puesto que los efectos tóxicos de este contaminante emergente sobre el crecimiento de esta especie son notorios en las concentraciones más bajas ensayadas: 10 mg/L (Tabla 1).

El florfenicol, que se trata de un agente antibacteriano, ejerce un efecto citotóxico sobre cada uno de los microorganismos ensayados. Aún así dicho efecto difiere entre los microorganismos Gram – positivos y Gram – negativos en cuanto a las concentraciones a las se detecta el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de estas bacterias. De este modo, en *Bacillus sp* y *Staphylococcus aureus* la CMI es de 10 mg/L. En *Serratia marcescens* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la CMI se caracteriza por ser más elevada, presentando así un valor de 1000 mg/L (Tabla 1).

Por último, el triclosán ha presentado un efecto muy similar al florfenicol, donde, nuevamente, se observa que el efecto es mucho más elevado en los microorganismos pertenecientes al grupo de las bacterias Gram – positivas, como se puede observar en *Staphylococcus aureus*, donde la CMI es de 10 mg/L. Por otro lado, *Serratia marcescens*, bacteria Gram- negativa, presenta una CMI de 1000 mg/L (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria de los microorganismos ensayados

CONTAMINANTES (mg/L)	<i>Bacillus sp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
IBUPROFENO	-	-	-	-
ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	1000	1000	1000	1000
FLORFENICOL	10	10	1000	1000
TRICLOSÁN	100	10	1000	100
BISFENOL –A	-	10	-	-
DICLOROFENACO	-	100	1000	1000

5. DISCUSIÓN

A la vista de los resultados descritos, se puede establecer que hay una serie de contaminantes emergentes que parecen presentar un efecto citotóxico imperceptible a las concentraciones ensayadas (Fig.8): uno de ellos es el ibuprofeno. Se caracteriza por no presentar citotoxicidad sobre ninguno de los microorganismos ensayados a las concentraciones y tiempos de exposición testados en el presente trabajo.

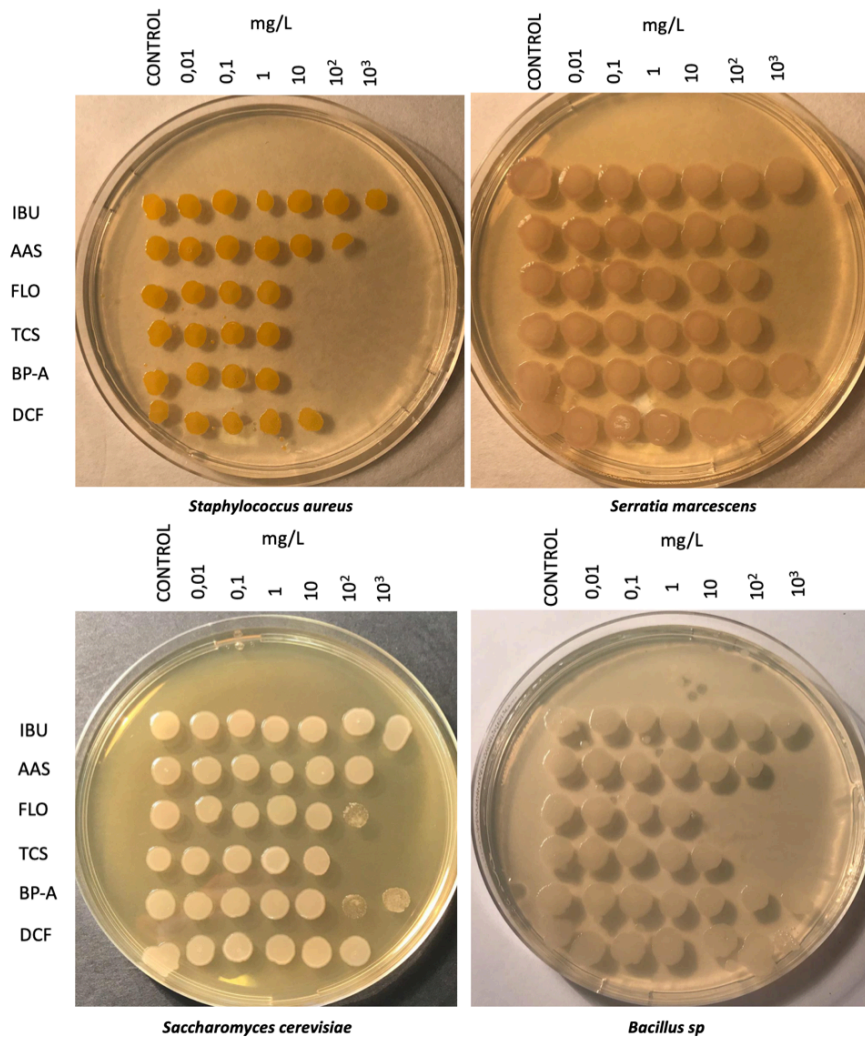


Figura 8. Formación de *spots* tras la exposición de los microorganismos a los contaminantes emergentes

Algo similar sucede con el bisfenol A, que a excepción de *Staphylococcus aureus*, tampoco produce un potencial efecto citotóxico. Por su parte, el ácido acetilsalicílico sí que inhibe el crecimiento, pero solo actuando a concentraciones muy elevadas, por lo que de esta forma se ha podido establecer que su CMI es de 1000 mg/L en *Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* y *Saccharomyces cerevisiae* (Tabla 1). El hecho de que este grupo de contaminantes no ejerza ningún efecto inhibitorio o, en el caso de hacerlo, sea a la concentración testada más elevada, es un indicativo que, de los contaminantes emergentes ensayados, éstos son los que presenten una menor toxicidad sobre organismos no diana como los utilizados en este trabajo.

Sin embargo, se ha podido observar que los compuestos más citotóxicos son el florfenicol y el triclosán ya que presentan un potencial efecto tóxico a concentraciones relativamente bajas (Tabla1). Ambos son agentes antimicrobianos, por lo que dichos valores pueden deberse a su propio mecanismo de acción.

Por otro lado, de los microorganismos ensayados, se ha podido observar que *Staphylococcus aureus* ha mostrado una mayor sensibilidad a las diferentes sustancias probadas en comparación con el resto de los microorganismos (Fig. 8). Esto podría deberse a las diferencias en cuanto a la estructura celular que presentan los microorganismos utilizados: *Bacillus sp* y *Staphylococcus aureus* pertenecen al grupo de bacterias Gram – positivas. *Serratia marcescens* se trata de una bacteria Gram – negativa y *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura. Ya otros autores han demostrado que las bacterias Gram – negativas son más resistentes que las Gram – positivas, sugiriendo que dicha resistencia puede deberse al potencial efecto protector de la membrana lipídica externa de la pared celular (21).

Además, en el caso concreto de *Bacillus sp*, su crecimiento no se ha visto afectado por varios de los compuestos ensayados como el bisfenol o el diclorofenaco (Fig.8). De todos los microorganismos ensayados, éste es el único que se caracteriza por la formación de endosporas. El hecho de que sea capaz de producirlas le otorga un mecanismo de resistencia bajo determinadas condiciones de estrés (22), por lo que puede presentar

mayor capacidad de supervivencia y que de esta forma siga creciendo ante la presencia de determinadas sustancias como alguna de las ensayadas en el presente trabajo. Por ello, en futuros ensayos sería interesante realizar una tinción para detectar la potencial formación de endosporas en los cultivos de esta especie expuestos a contaminantes.

En cuanto a *Saccharomyces cerevisiae* (Fig.8), se observa que los valores de concentración mínima inhibitoria obtenidos para todos los compuestos ensayados son mayores en comparación con los obtenidos para las bacterias estudiadas. Cabe destacar que se trata de una levadura que pertenece al dominio eucariota. Se caracteriza por presentar una estructura celular más compleja con la presencia de pared celular la cual puede ayudar a que los contaminantes ensayados le afecten en menor medida. Investigaciones relativamente recientes han demostrado que el efecto citotóxico del triclosán es bajo en *Saccharomyces cerevisiae*, donde la concentración mínima inhibitoria fue de 1000 mg/L (23). El triclosán se trata de un agente antibacteriano, por lo que se esperan efectos más acusados sobre bacterias, tal y como se comprueba en este trabajo.

6. CONCLUSIÓN/CONCLUSIÓN/CONCLUSION

CONCLUSIÓN

El método empleado en el presente trabajo ha demostrado ser útil ya que ha permitido obtener información sobre el potencial efecto citotóxico de varios contaminantes emergentes sobre diferentes microorganismos. De esta forma se ha podido observar que *Staphylococcus aureus* se trata del microorganismo más sensible de todos los estudiados, ya que es el que más afectado se ha visto por un mayor número de contaminantes. Además, cabe destacar que, de todos los contaminantes emergentes ensayados, el florfenicol, el triclosán y el bisfenol A son los que mayor efecto citotóxico han reportado, ya que los valores de concentración mínima inhibitoria obtenidos han sido los más bajos en comparación con el resto de contaminantes ensayados.

CONCLUSIÓN

O método empregado no presente traballo demostrou ser útil xa que nos permitiu obter información sobre o potencial efecto citotóxico de varios contaminantes emerxentes sobre distintos microorganismos. Deste xeito, observouse que *Staphylococcus aureus* é o microorganismo máis sensible, xa que é o que máis se viu afectado por un maior número de contaminantes. Además, cabe sinalar que, de todos os contaminantes emerxentes probados, o florfenicol, o triclosán e o bisfenol A teñen os efectos citotóxicos máis altos, xa que os valores da concentración mínima inhibitoria foron os máis baixos en comparación co resto de contaminantes probados.

CONCLUSION

The method used in this work has proved that it is useful because it allowed us to obtain information about the potencial cytotoxic effect of several emerging pollutants in different microorganisms. In this way it has been detected that *Staphylococcus aureus* is the most sensitive microorganism of all that we have studied. Also we have to talk about that of all the emerging pollutants tested, florfenicol, triclosan and bisphenol A have the highets effects.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Barceló D, López de Alda MJ. 2008. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. (Barcelona).
2. Rubio Clemente A, Chica Arrieta EL, Peñuela Mesa GA. Procesos de tratamento de aguas residuales para la eliminación de contaminantes orgánicos emergentes. *Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*. 2013;8(3):93-103. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1176>.

3. Peña-Álvarez A, Castillo-Alanís A. Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida- cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM), TIP, Rev. Espec. Cienc. Quím.-Biol. 2015;18 (01):29–42. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.05.003>
4. Barceló D. Emerging pollutants in water analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2003; 22(10): xiv–xvi. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01106-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01106-3)
5. Moro I, Matozzo V, Piovan A *et al.* Morphophysiological effects of ibuprofen on *Scenedesmus rubescens*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2014; 38: 379-387.
6. Papamija M, Sarria V. Degradación fotocatalítica del ibuprofeno empleando dióxido de titanio. *Revista de Ingeniería*.2010;31:47-53. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ring/n31/n31a6.pdf>.
7. Braña MF, Del Río L, Trives C *et al.* La verdadera historia de la aspirina. *Real Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2005; 71: 813-819.
8. Lonappan L, Brar SK, Das RK *et al.* Diclofenac and its transformation products: environmental occurrence and toxicity-a review. *Environment International*. 2016; 96: 127-138.
9. Bhargava HN, Leonard PA. Triclosan: Applications and safety. *American Journal of Infection Control*. 1996; 24(3): 209–218. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0196-6553\(96\)90017-6](https://doi.org/10.1016/S0196-6553(96)90017-6)
10. Dann AB, Hontela A. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Journal of Applied Toxicology*. 2010;31(4):285–311. Disponible en: doi:10.1002/jat.1660

11. Seoane, M. Efecto tóxico de microcontaminantes acuáticos emergentes sobre microalgas marinas mediante el análisis de biomarcadores de citotoxicidad [tesis doctoral]. Universidade da Coruña; 2018.
12. PubChem. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Florfenicol>>. Consultado el 19/08/19
13. Staples CA, Dome PB, Klecka GM *et al.* A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*.1998;36(10):2149–2173. doi:10.1016/s0045-6535(97)10133-3
14. Repetto G, Jos A, Hazen MJ *et al.* A test battery for the ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol. *Toxicology in Vitro*. 2001;15(4-5):503-509. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(01\)00055-8](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(01)00055-8)
15. Franqueira D, Orosa M, Torres E *et al.* Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. *Sci Total Environ*. 2000; 247(2-3): 119-126.
16. Ingraham, J.L.; Ingraham, C.A. (1998). Las Bacterias, Introducción a la Microbiología (pp. 247- 272). Barcelona: Editorial Reverté.
17. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales de *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinamer Patol Clin*. 2014; 61: 28-40.
18. Hejazi A, Falkiner FR. *Serratia marcescens*. *Journal of medical microbiology*. 1997; 46(11):903-912. Disponible en: <https://doi.org/10.1099/00222615-46-11-903>
19. CSIC: Consejo Superior De Investigaciones Científicas < <https://www.csic.es>>. Consultado el 21/08/19.

20. De la Fuente-Salcido NM, Villarreal-Prieto J, Díaz León Miguel A *et al.* Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*. 2015; 46(2):7-16.
21. Acevedo LR, Severiche CA. Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. *Producción + Limpia*. 2015; 10(2):160-172
22. Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira- Chávez LA *et al.* The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2017; 36(1): 95-130. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1706-5
23. Suppi S, Kasemets K, Ivask A *et al.* A novel method of comparison of biocidal properties of nanomaterials to bacteria, yeasts and algae. *Journal of Hazard Materials*. 2015; 286: 75-84. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.027>