



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS

GRADO EN BIOLOGÍA

MEMORIA DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO

TOXICIDAD DE MICROCONTAMINANTES
ACUÁTICOS SOBRE ORGANISMOS UNICELULARES

TOXICIDADE DE MICROCONTAMINANTES
ACUÁTICOS SOBRE ORGANISMOS UNICELULARES

TOXICITY OF AQUATIC MICROPOLLUTANTS ON
UNICELLULAR ORGANISMS

Dirigido por la Dra. Carmen Rioboo Blanco

Convocatoria: Febrero | Curso 2019-2020

Sara Sueiro Carrero

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutora Carmen Rioboo Blanco y a los integrantes del Laboratorio de Microbiología de esta facultad. Así mismo también deseo agradecer a la doctora Soledad Muniategui Lorenzo del Laboratorio de Química Analítica Aplicada de la Universidade da Coruña, por la cesión de los microplásticos de polipropileno empleados en este estudio.

Índice

Resumen

1. Introducción	1
2. Objetivos	3
3. Material y métodos	3
3.1. Descripción de la especie microalgal	3
3.2. Descripción del compuesto ensayado	4
3.3. Descripción de los microplásticos de polipropileno	5
3.4. Cultivo microalgal	6
3.5. Diseño experimental	6
3.6. Determinación de la tasa de crecimiento	7
3.7. Determinación de la viabilidad celular	7
3.8. Determinación de clorofila <i>a</i>	8
3.9. Análisis estadístico	8
4. Resultados	9
4.1. Estudio del efecto tóxico del BPA sobre <i>C. reinhardtii</i>	9
4.2. Estudio de la potencial interacción toxicológica entre el BPA y los microplásticos de PP sobre <i>C. reinhardtii</i>	12
5. Discusión	13
6. Conclusiones	15
7. Bibliografía	16
Abreviaturas	19

Resumen

Los microplásticos de polipropileno (PP) son uno de los polímeros más abundantes en el mar. Estos causan graves problemas relacionados con el estrés por ingestión o la contaminación por aditivos asociados a ellos. A su vez, el bisfenol A (BPA) es un microcontaminante emergente muy utilizado en la industria, que puede alcanzar con facilidad los ecosistemas acuáticos y afectar potencialmente al sistema endocrino de los organismos. Por ello estos contaminantes son objeto de estudio en la actualidad, pues se consideran una amenaza real para los medios acuáticos y los organismos asociados a estos, como las microalgas.

En este trabajo se ha estudiado el potencial efecto tóxico del BPA sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii*, así como la potencial interacción entre la presencia de microplásticos de polipropileno y el efecto tóxico del BPA sobre la microalga. Los resultados obtenidos del estudio revelaron un significativo efecto inhibitorio del BPA en todos los parámetros estudiados (tasa de crecimiento, densidad celular y contenido celular de clorofila *a*), y además, la existencia de una interacción entre los dos contaminantes, pues los microplásticos de PP eliminaron los efectos tóxicos de las concentraciones ensayadas del BPA sobre *C. reinhardtii*.

Palabras clave: *Chlamydomonas reinhardtii*, polipropileno, bisfenol A, microplástico, contaminante emergente, toxicidad.

Resumo

Os microplásticos de polipropileno (PP) son un dos polímeros máis abundantes no mar, e causan graves problemas relacionados co estrés por inxestión ou a contaminación por aditivos asociados a eles. Á súa vez, o bisfenol A (BPA) é un microcontaminante emerxente moi utilizado na industria, que pode alcanzar facilmente os ecosistemas acuáticos e afectar potencialmente ao sistema endocrino dos organismos. Na actualidade estúdanse este tipo de contaminantes, pois considéranse unha ameaza perxudicial para os ambientes acuáticos e os organismos asociados a estes, como as microalgas.

Neste traballo estudouse o potencial efecto tóxico do BPA sobre a microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, así como a posible interacción entre a presenza de microplásticos de polipropileno e o efecto tóxico do BPA sobre a microalga. Os resultados obtidos co estudo revelaron un significativo efecto inhibitorio do BPA nos parámetros estudados de crecemento dos cultivos, viabilidade celular e contido celular de clorofila *a*, e, tamén, a existencia dunha interacción entre os dous contaminantes, posto que os microplásticos de PP eliminaron os efectos tóxicos das concentracións analizadas de BPA sobre *C. reinhardtii*.

Palabras clave: *Chlamydomonas reinhardtii*, polipropileno, bisfenol A, microplástico, contaminante emergente, toxicidade.

Abstract

Polypropylene microplastics (PP) are one of the most abundant polymers in the sea. They are known to trigger deleterious effects related with its ingestion or contamination by additives associated with them. On the other hand, bisphenol A (BPA) is an emerging micropollutant widely used in industry. BPA can easily reach aquatic ecosystems and potentially affect the endocrine system of several organisms. As both pollutants are considered a threat to aquatic media and the organisms related with it, such as microalga, they are currently under study.

In this report we have been studied the potential toxic effect of BPA on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, as well as the potential interaction between PP microplastics and BPA pollutant on the microalga. The obtained results have revealed a significant deleterious effect on culture growth, cellular viability and cellular content of chlorophyll *a* on *Chlamydomonas reinhardtii*. In addition, the study also suggested an interaction between the two pollutants, so that polypropilene microplastics reduce the toxic effects of BPA concentrations in this microalga.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, polypropilene, bisphenol A, microplastic, emerging pollutant, toxicity.

1. Introducción

La presencia de contaminantes está provocando que una importante cantidad de medios acuáticos y los organismos que habitan en ellos se encuentren potencialmente en peligro. Estudios recientes realizados por la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos, reflejan que un 14,4% de sus aguas costeras presentan una calidad química del agua calificada como pobre, mientras que tan sólo un 36,4% se encuentran en condiciones buenas (EPA, 2019). Esto se debe, fundamentalmente, a que en algún momento del denominado ciclo del agua se produce la incorporación de sustancias no deseables que alteran la calidad química de la misma. En la actualidad, actividades antropogénicas, tales como la industria, la agricultura o el transporte, son una fuente de numerosos contaminantes emergentes presentes en medios acuáticos (Gavrilescu *et al.*, 2015).

Los contaminantes emergentes se definen como cualquier químico sintético o natural que no se controla o regula habitualmente en el medio ambiente, con efectos ecológicos y sobre la salud pública potencialmente adversos (UNESCO, 2020). Algunos de estos contaminantes se reconocen como productos de cuidado personal (PPCPs: *Pharmaceuticals and Personal Care Products*) y hacen referencia a aquellos utilizados en el cuidado de la salud, cosméticos o fármacos. Estos compuestos alcanzan el medio ambiente por medio de la excreción, los desechos domésticos e industriales o las aguas residuales (SCIEEX, 2019). El contaminante emergente estudiado en el presente trabajo, el bisfenol A, es un tipo de aditivo que afecta potencialmente al sistema endocrino de los organismos acuáticos, teniendo impactos en la movilidad, la reproducción y el desarrollo de los mismos (Anderson *et al.*, 2016).

Igualmente existe a su vez una preocupación global por el incremento de la presencia de plásticos en los ecosistemas, puesto que en los últimos 60 años se ha incrementado notablemente la producción y el consumo de los mismos (Avio *et al.*, 2017). Datos provenientes de *Plastics Europe* (2019), muestran que su producción ha pasado de 0,5 millones de toneladas año⁻¹ en 1960 a 360 millones de toneladas año⁻¹ en 2018.

El término plástico se utiliza para referirse a una familia de polímeros orgánicos derivados de fuentes de petróleo, siendo los más utilizados actualmente el polipropileno (PP), el polietileno (PE) y el poliestireno (PS). Se denomina microplástico a aquella partícula cuyo rango de tamaño no supere los 5 mm (ECHA, 2020). En función de su procedencia, se diferencia entre microplásticos primarios si derivan de productos cosméticos o de cuidado personal y microplásticos secundarios si se originan por la degradación de plásticos mayores. Estos plásticos alcanzan los sistemas de agua dulce fundamentalmente por tres vías: por medio de la descarga de efluentes procedentes de plantas de tratamiento de aguas, por desbordamiento de alcantarillas de aguas residuales durante lluvias intensas y por escorrentía del lodo aplicado a la tierra agrícola. Finalmente, el flujo de los sistemas

de agua dulce conduce los microplásticos hasta ríos, lagos y océanos (Anderson *et al.*, 2016).

Este deterioro de los ecosistemas acuáticos ha promovido la realización de estudios toxicológicos y de impacto ambiental, utilizándose como indicadores de contaminación diferentes organismos acuáticos como las microalgas.

Bajo el término microalga se engloba un grupo de microorganismos unicelulares ricos en clorofila y que realizan fotosíntesis oxigénica, con representantes tanto eucariotas como procariotas. Son microorganismos ubicuos de masas de agua tanto dulces como saladas, y se han adaptado a todo tipo de hábitats, desde corales tropicales a regiones polares (Day *et al.*, 1999), donde forman el primer eslabón de las cadenas tróficas como productores primarios.

Hoy por hoy se utilizan en un amplio abanico de aplicaciones biotecnológicas, tales como: incremento del valor nutritivo de los alimentos, incorporación en productos cosméticos, acuicultura o producción de metabolitos y biocombustibles. Además, como se acaba de comentar, recientemente han comenzado a utilizarse como organismos de ensayo en estudios toxicológicos y de impacto ambiental, como el de Li *et al.* (2009) o Seoane *et al.* (2014). Asimismo, estudios como el de Matamoros *et al.* (2015) sugieren que estos microorganismos presentan una elevada capacidad para degradar contaminantes, y que además, lo hacen alterando en menor medida que los tratamientos tradicionales las características del medio, manteniendo, por ejemplo, los nutrientes presentes en el ecosistema. En el presente trabajo se ha seleccionado la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii*, una de las especies microalgales más utilizada actualmente para esta clase de estudios, Wang *et al.* (2008); Esperanza *et al.* (2016); De Almeida *et al.* (2017).

Diversos estudios recientes han sugerido que las microalgas pueden verse afectadas también por la presencia de microplásticos en los sistemas acuáticos. Zhang *et al.* (2017) observaron que los microplásticos de policloruro de vinilo (PVC) inhiben el crecimiento de la microalga *Skeletonema costatum* y ejercen un efecto negativo sobre la fotosíntesis, reduciendo el contenido de clorofilas y la eficiencia fotosintética en esta especie. Por lo general, los microplásticos son hidrofóbicos y tienen grandes áreas de superficie, lo que les permite acumular contaminantes orgánicos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) o, entre otros, polibromodifenil éteres (PBDE). No obstante, también se pueden asociar a otros componentes como metales pesados o aditivos, como el bisfenol A (Anderson *et al.*, 2016).

A pesar de esto, en la mayoría de los trabajos ecotoxicológicos realizados hasta la fecha, los organismos de ensayo se exponen aisladamente, o bien a un contaminante, o bien a un tipo de microplástico. Dado que estos ensayos no reflejan la realidad de los organismos en el ambiente, es importante realizar estudios multifactoriales donde se describan las potenciales interacciones entre la toxicidad ejercida por un compuesto químico y la presencia de microplásticos en el medio.

2. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo es evaluar el potencial efecto tóxico del bisfenol A sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii*, así como estudiar la potencial interacción entre la presencia de microplásticos de polipropileno en el medio y la toxicidad de este contaminante emergente.

Para ello, se utilizarán los siguientes parámetros clásicamente empleados en ensayos de toxicidad con microalgas: tasa de crecimiento celular, viabilidad celular y contenido celular de clorofila *a*.

3. Material y métodos

3.1. Descripción de la especie microalgal

Para este estudio se ha utilizado la especie *Chlamydomonas reinhardtii* como organismo modelo, descrita por primera vez por Dangeard en 1888. Se trata de una microalga dulceacuícola que pertenece al filo Chlorophyta, clase Chlorophyceae, orden Volvocales y familia Chlamydomonadaceae (Bold & Wynne, 1985). El género *Chlamydomonas* ha sido utilizado para estudiar la fotosíntesis eucariótica debido a su capacidad de mantener la funcionalidad del aparato fotosintético durante el crecimiento en oscuridad, y, además, su estudio ha derivado en su aplicación en nuevos campos de investigación como la biorremediación y la obtención de biocombustibles (Merchant *et al.*, 2007).

En las últimas décadas, *C. reinhardtii* se ha empleado como sistema modelo en biología celular y molecular gracias a varias características de esta especie, como la facilidad para el cultivo en el laboratorio y, especialmente, la ventaja de tener el genoma completo secuenciado (Jeanneret *et al.*, 2016).

Esta alga unicelular biflagelada (Figura 1) presenta un cuerpo celular esferoide de aproximadamente de 10 μm de diámetro. La mayor parte de su citoplasma se encuentra ocupado por un único cloroplasto en el que se produce la captura de la luz y la fotosíntesis. En la parte central de la célula se ubica un órgano rudimentario llamado ‘mancha ocular’ que es sensible a la luz y está compuesto por subunidades de carotenoides que ayudan en la fototaxis. Próximo a las vacuolas contráctiles se sitúan dos cuerpos basales, a partir de los cuales se originan los dos flagelos móviles de 10-12 μm de longitud. El cuerpo celular está encerrado en una pared celular de 200 nm de espesor compuesta de siete capas distintas, dentro de las cuales se contiene una capa cristalina glicoproteica, y se caracterizan por la ausencia de celulosa (Bold & Wynne, 1985). Las



Figura 1. Imagen de una célula biflagelada de *C. reinhardtii*, con una longitud celular de 10 μm (Harris, 2001).

células vegetativas son haploides y pueden reproducirse de forma indefinida en este estado, en el que la reproducción asexual tiene un ciclo de aproximadamente un día. También pueden experimentar reproducción sexual (Jeanneret *et al.*, 2016).

La cepa utilizada de *Chlamydomonas reinhardtii* (CCAP 11/32A; mt+) se ha obtenido de la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos (CCAP; Culture Collection of Algae and Protozoa) del Laboratorio Marino de Dunstaffnage (Escocia, Reino Unido).

3.2. Descripción del compuesto ensayado

El contaminante ambiental utilizado en este trabajo es el 4,4'-dihidroxi-2,2difetilpropano comúnmente llamado bisfenol A (BPA). Este compuesto (Figura 2), de fórmula $C_{15}H_{16}O_2$ y peso molecular de 228 g mol^{-1} , se obtiene de la combinación de dos moléculas de fenol con una molécula de acetona (Staples *et al.*, 1998).

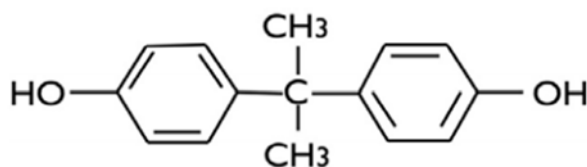


Figura 2. Estructura molecular del bisfenol A (García *et al.*, 2015)

Es un compuesto químico moderadamente soluble (120 a 300 mg L^{-1}), que puede adsorberse a los sedimentos, tiene baja volatilidad y no perdura en el medio durante largos periodos de tiempo, debido a su rápida biodegradación en plantas de tratamiento de aguas residuales y aguas

receptoras. Está clasificado como un compuesto moderadamente tóxico, presentando un valor para la concentración efectiva media (EC_{50} : *median effective concentration*) ensayada sobre el crecimiento algal de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$. Sin embargo, tiene un bajo potencial de bioacumulación en los organismos acuáticos (Staples *et al.*, 1998).

Fue sintetizado por primera vez en 1891 por el químico ruso Aleksandr Dianin, pero hasta principios de 1930 no se conocieron sus propiedades toxicológicas y actividad estrogénica (Dodds & Lawson, 1936). Pertenece a un grupo de compuestos denominados 'disruptores endocrinos' (DE), que son "sustancias exógenas al organismo que se encuentran en el medio ambiente, en los alimentos y en los productos destinados a los consumidores, que interfieren con la biosíntesis de hormonas, el metabolismo y en las acciones resultantes de estas, provocando una alteración en la homeostasia normal del individuo expuesto o en la de sus descendientes" (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

El BPA se utiliza mucho en la industria como elemento y/o componente destinado a la fabricación de plásticos y resinas epoxi. Los productos finales tienen distintos tipos de aplicaciones, como el uso en envases de alimentos y bebidas, papel térmico, adhesivos, materiales de construcción, lentes ópticas, etc. (Staples *et al.*, 1998).

Los seres humanos están expuestos a BPA de manera habitual, siendo la exposición a través de la dieta, envases de comida y bebida, la fuente más importante de riesgo. La

toxicidad del BPA se ha visto implicada en problemas relacionados con la salud, siendo estos: proliferación celular y cáncer, alteraciones en el desarrollo y maduración celular, estrés oxidativo y daño en el material genético, y afectación a nivel metabólico, reproductivo, cardiovascular y neuronal (García *et al.*, 2015).

Por todo ello, se han comenzado a realizar estudios que determinan los efectos ambientales de este compuesto, puesto que alcanza con facilidad el medio acuático y sus niveles de producción anuales alcanzan cifras elevadas dentro del orden de millones de toneladas (FitzGerald & Wilks, 2014). También se han descrito procesos bióticos y abióticos que actúan para dispersar y degradar el BPA que se libera al medio. Por ejemplo, varios estudios han mostrado una notable capacidad de degradación del BPA por parte de poblaciones microbianas (Staples *et al.*, 1998).

3.3. Descripción de los microplásticos de polipropileno

En el presente estudio se ha empleado polipropileno (PP) en formato de microplásticos, dispuestos en partículas con un diámetro promedio de 1-2 mm, de forma irregular. Han sido facilitados por el laboratorio de Química Analítica Aplicada de la Universidade da Coruña. Se trata de microplásticos libres de aditivos y con un grado de pureza del 100%, tal y como se confirmó mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en dicho laboratorio.

El polipropileno fue descubierto en 1954 y, muy pronto, adquirió una gran popularidad al presentar la densidad más baja dentro de los plásticos básicos. Se trata de un polímero preparado catalíticamente a partir del propileno que se origina por un proceso de conexión de monómeros llamado polimerización

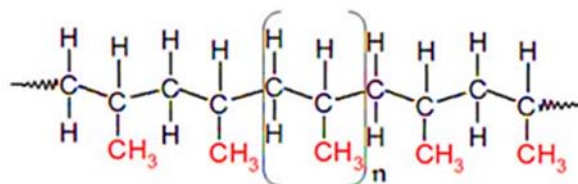


Figura 3. Estructura del polipropileno (Maddah, 2016).

(Figura 3). Dentro de sus características destaca por presentar una gran resistencia a las altas temperaturas, permitiendo su uso en artículos como envases de alimentos, bandejas, embudos, cubos, botellas, etc. (Maddah, 2016).

La densidad de los polímeros plásticos influye principalmente en su flotabilidad, el PP debido a su baja densidad (0,89-0,91 g/cm³) tiende a flotar en la columna de agua. Sin embargo, procesos como la bioincrustación y la colonización de organismos en su superficie aumentan el peso de las partículas, acelerando así su hundimiento hacia los sedimentos del fondo (Avio *et al.*, 2017).

3.4. Cultivo microalgal

Los cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* se realizaron en medio tris-acetato-fosfato (TAP: *tris-acetate-phosphate*) modificado, sin acetato, y con nitrato como fuente de nitrógeno. El medio de cultivo y todo el material empleado se esteriliza en un autoclave a 121°C durante 20 min. Posteriormente, y en condiciones asépticas, a este medio se le adiciona una solución de oligoelementos (Algal-1, Nutrición Avanzada S. A.).

Tanto los cultivos *stock* como los experimentales, se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 ml con un volumen de cultivo de 50 ml y a una densidad inicial de 200.000 células ml^{-1} , utilizándose como inóculo cultivos en fase exponencial. Se mantuvieron en una cámara bajo condiciones controladas de iluminación y temperatura, concretamente $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e iluminación artificial con intensidad lumínica de $70 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de luz:oscuridad de 12:12 h. Asimismo, los matraces permanecieron en el interior de la cámara en agitación circular constante a 150 rpm.

3.5. Diseño experimental

Con el objetivo de evaluar los potenciales efectos tóxicos causados por el BPA y el PP sobre *Chlamydomonas reinhardtii* se han realizado dos ensayos independientes, ambos con una duración de 72 horas.

En el primer ensayo, los cultivos microalgales se dispusieron en matraces de 25 ml, que se expusieron a dos concentraciones nominales de BPA, 30 y 60 mg L^{-1} , siendo el primer valor el correspondiente a la EC_{50} calculada sobre la inhibición del crecimiento de *C. reinhardtii* a las 96 horas de exposición a este contaminante, y el segundo, 60 mg L^{-1} , el correspondiente al doble del valor de dicha EC_{50} (Figura 4). Estas concentraciones finales de contaminante en el medio de cultivo se obtuvieron a partir de una solución *stock* preparada con metanol, de modo que en todos los cultivos se mantuvo una concentración final de metanol de 0,025% (v/v), la cual no afecta significativamente a los parámetros de toxicidad estudiados en el presente trabajo de *C. reinhardtii*. De esta manera, los matraces utilizados como control se prepararon siempre con esta concentración de metanol, pero libres de contaminante.

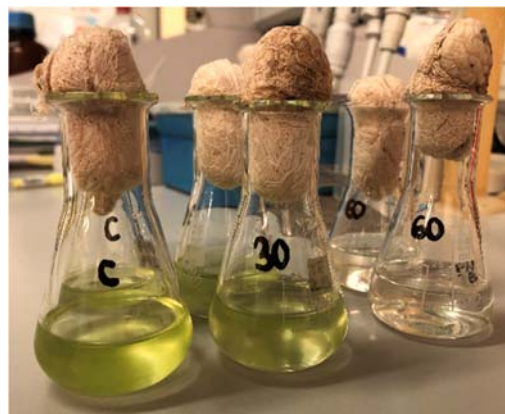


Figura 4. Imagen de los matraces con los cultivos microalgales en exposición a dos concentraciones de BPA, 30 y 60 mg L^{-1} , así como los matraces control.

Por otro lado, en el segundo ensayo realizado se analizó el efecto de la presencia de microplásticos de PP sobre la toxicidad ejercida por el BPA sobre *C. reinhardtii*. Para ello se emplearon las mismas condiciones y concentraciones de BPA del ensayo anterior,

pero añadiendo un 1% (p/v) de microplásticos a cada uno de los matraces (incluyendo a los cultivos control).

Por último, para todas las condiciones ensayadas los cultivos se prepararon por duplicado.

3.6. Determinación de la tasa de crecimiento

La densidad celular de los cultivos microalgales para el cálculo de la tasa de crecimiento se ha estudiado mediante conteo en cámaras modelo *Neubauer*, con el apoyo de un microscopio óptico de fases *Nikon Eclipse E400* bajo un objetivo de 20x. En caso de que las muestras se encontrasen muy concentradas, se realizaron diluciones con medio de cultivo, permitiendo que el recuento se mantuviese entre 20-200 células por cuadrante.

Los contajes celulares se realizaron a las 0 y 72 horas de exposición a los contaminantes, y mediante el uso de la siguiente fórmula se calculó la tasa de crecimiento celular (μ):

$$\mu = [\ln (N_f) - \ln (N_0)] / \ln 2 (t_f - t_0)$$

En esta fórmula μ es la tasa de crecimiento en días⁻¹, N_f y N_0 representan las densidades celulares finales e iniciales en células ml⁻¹ y, t_f y t_0 son el tiempo final e inicial en días.

3.7. Determinación de la viabilidad celular

El estudio de la viabilidad celular de los cultivos microalgales se ha realizado mediante el ensayo de hidrólisis enzimática del diacetato de fluoresceína (FDA: *Fluorescein diacetate*), que permite distinguir las células viables de las no viables.

El FDA es un compuesto no fluorescente que debido a sus propiedades lipofílicas penetra en las células viables, donde puede ser hidrolizado por un gran número de enzimas como proteasas, lipasas y esterases. El producto de esta reacción enzimática es la liberación de la fluoresceína, excitable a 490 nm y con una emisión de fluorescencia máxima a 525 nm. Es un compuesto fluorescente que no tiene capacidad para atravesar las membranas celulares por lo que queda retenido en su interior, permitiendo la visualización del mismo mediante el uso de microscopios de fluorescencia (Schnurer & Rosswall, 1982).

Para este análisis se han utilizado alícuotas de 500 μ l de cada una de las muestras, a las que 15 minutos antes de la observación al microscopio se les añadió en oscuridad 1 μ l de una solución de FDA de 50 μ g ml⁻¹. Tras el tiempo de espera se realizaron contajes de 50 células al azar, observando, mediante un microscopio de epifluorescencia, cuántas células emitían fluorescencia (FDA+). Para ello se ha empleado un microscopio *Nikon Eclipse E600*, equipado con una lámpara de mercurio y utilizando un filtro de excitación entre 450-490 nm de longitud de onda.

Los resultados se expresan en porcentaje de células viables (FDA+) frente al total de células estudiadas.

3.8. Determinación de clorofila *a*

Por último, el estudio de este pigmento fotosintético se realizó a partir de alícuotas de 12 ml de cada una de las muestras, que se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm en una centrífuga *Multifuge 3L-R Heraeus*. Después se resuspendió el *pellet* celular en 3 ml de acetona:metanol (2:1). Posteriormente, se guardaron los tubos cerrados en una gradilla envuelta en papel aluminio, para que permaneciesen en oscuridad durante 24 horas en una nevera a 4°C. Tras esperar 24 horas, tiempo suficiente para la extracción de los pigmentos del interior celular, se centrifugaron los tubos durante 10 minutos a 3000 rpm en la misma centrífuga, con el fin de eliminar los restos celulares. El sobrenadante obtenido se mide en un espectrofotómetro *Shimadzu UV-160A* para la obtención de las absorbancias requeridas a dos longitudes de onda, 664 y 647 nm.

Para calcular la concentración de este pigmento en $\mu\text{g ml}^{-1}$ se ha utilizado la siguiente fórmula (Jeffrey & Humphrey, 1975):

$$[\text{clorofila } a] = (11,93 \cdot A_{664}) - (1,93 \cdot A_{647})$$

siendo A_{664} y A_{647} las absorbancias medidas a 664 y 647 nm respectivamente.

3.9. Análisis estadístico

Se ha realizado un análisis estadístico de los resultados obtenidos de crecimiento, viabilidad celular y contenido celular de clorofila *a*. Para ello se han utilizado los programas Excel 2016, SigmaPlot y el Software IBM SPSS.

En primer lugar, los datos de los diferentes tratamientos se han expresado como variación con respecto al control (%), y se han calculado las medias y desviaciones estándar de cada uno de los controles y tratamientos empleando el programa Excel 2016. A continuación, con el software IBM SPSS se estudiaron dos hipótesis diferentes.

La primera hipótesis, “la exposición al BPA no afecta al parámetro medido en el cultivo microalgal”, fue estudiada mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, prueba que posibilita comparar las distintas medias. Si el contraste ANOVA resulta significativo, entonces se rechaza la hipótesis nula y, por tanto, se concluye que las respuestas medias esperadas difieren significativamente al menos para dos de las muestras. Será entonces de interés detectar donde radican esas diferencias y para ello se ha aplicado la prueba *Post-hoc* del test de *Tukey*, que posibilita comparar por parejas todas las variables entre sí.

La segunda hipótesis, “no existe interacción entre la presencia de polipropileno y la toxicidad del BPA”, fue evaluada mediante un test ANOVA de dos factores, que permite analizar conjuntamente las variables plástico y concentración de contaminante para cada uno de los tres parámetros estudiados.

Los análisis ANOVA requieren el cumplimiento de una serie de hipótesis estructurales del modelo con relación a sus errores aleatorios (residuos). Deben seguir una distribución normal, ser independientes y presentar varianzas constantes; para ello se han estudiado respectivamente los test de *Shapiro-Wilk*, *Durbin-Watson* y *Kruskal-Wallis* (se ha optado por el uso del test no paramétrico *Kruskal-Wallis* en lugar del test de *Levene* debido a que el tamaño muestral es pequeño).

En cuanto a los parámetros utilizados en los *tests* estadísticos, se ha empleado siempre un nivel de significación de α de 0,05 ($p < 0,05$). Asimismo, para observar de manera gráfica los resultados obtenidos, tanto de medias y desviaciones, como los análisis de varianzas, se ha empleado el programa SigmaPlot.

4. Resultados

4.1. Estudio del efecto tóxico del BPA sobre *C. reinhardtii*

De manera general, los resultados obtenidos muestran un patrón de afectación similar en el efecto de BPA sobre los tres parámetros estudiados, la tasa de crecimiento, la viabilidad celular y el contenido de clorofila *a* de la microalga *C. reinhardtii*. La exposición a dicho contaminante ha provocado una inhibición en los valores obtenidos para estos parámetros con respecto a los cultivos control, y de manera dependiente de la concentración de BPA presente en el medio.

En primer lugar, se ha estudiado el crecimiento en los cultivos microalgales en base a las tasas de crecimiento. Como se observa en la Figura 5, la exposición a BPA provoca un descenso en la tasa de crecimiento conforme aumenta la concentración de contaminante en el medio, siendo la tasa de crecimiento del $0 \pm 11,48\%$ con respecto al control para la concentración de BPA más alta ensayada, 60 mg L^{-1} . El análisis estadístico de los resultados refleja que dicho efecto inhibitorio del BPA sobre el crecimiento de *C. reinhardtii* es significativo ($p < 0,05$) para las dos concentraciones ensayadas, 30 mg L^{-1} y 60 mg L^{-1} . Además, mediante el test de *Tukey*, se ha analizado la existencia de diferencias significativas en el efecto entre ambas concentraciones de contaminante, produciendo una inhibición del crecimiento mayor cuando la concentración de BPA es de 60 mg L^{-1} .

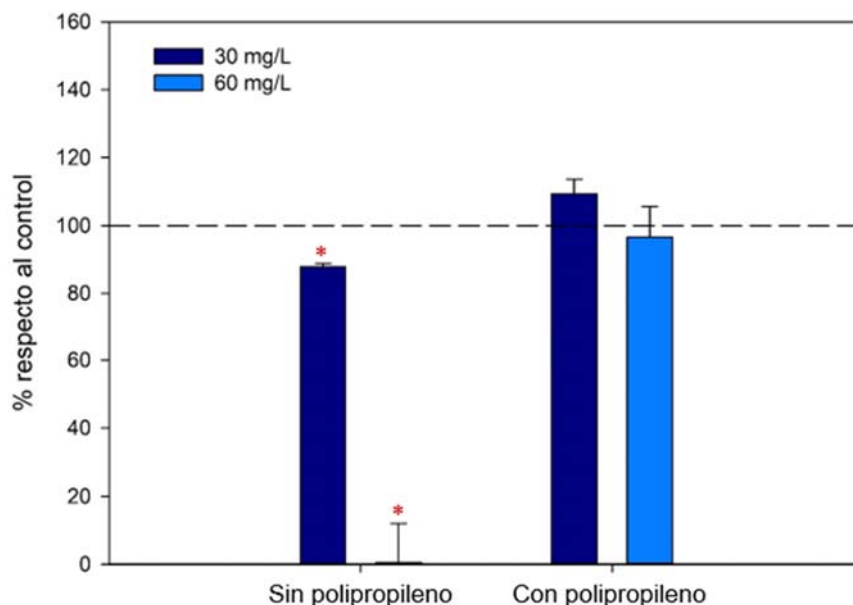


Figura 5. Tasas de crecimiento tras 72 horas de exposición a BPA. Los datos mostrados corresponden con los valores medios y las desviaciones estándar. La línea punteada refleja el valor de la muestra control, y los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de los tratamientos frente al control.

En segundo lugar, se analizaron los datos de viabilidad celular (Figura 6) obtenidos del ensayo de la hidrólisis enzimática del FDA. Para este parámetro, sólo en los cultivos cuya concentración de BPA era de 60 mg L^{-1} , se observa un descenso significativo ($p < 0,05$) del porcentaje de células viables de *C. reinhardtii* con respecto a los valores de la muestra control, registrándose así un porcentaje de viabilidad para dicha concentración de contaminante de $12 \pm 0\%$, frente a los valores de la muestra control de $100 \pm 0\%$.

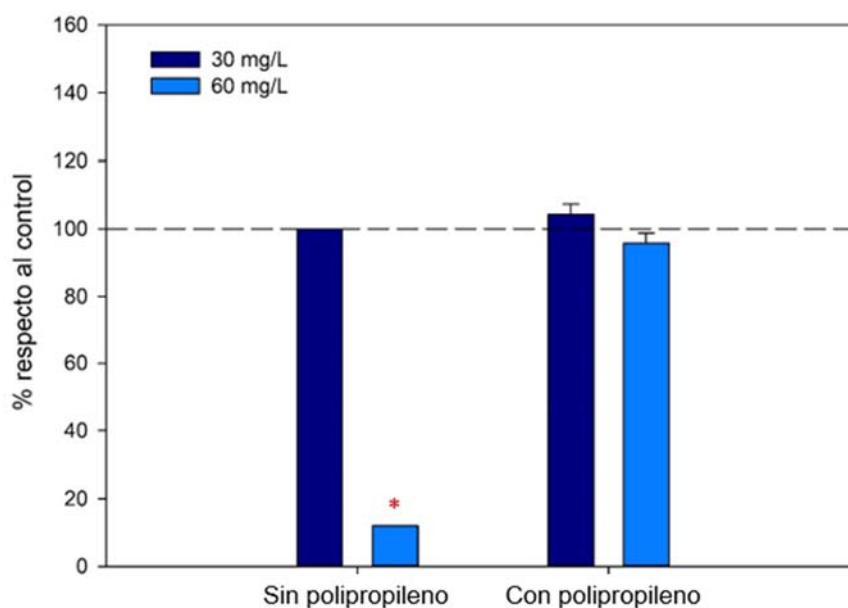


Figura 6. Viabilidad celular tras 72 horas de exposición a BPA. Los datos mostrados corresponden con los valores medios y las desviaciones estándar. La línea punteada refleja el valor de la muestra control, y los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de los tratamientos frente al control.

Por último, se analizaron los datos de contenido celular de clorofila *a* para los cultivos microalgales expuestos a BPA (Figura 7) y expresados como porcentaje con respecto a los valores obtenidos en los cultivos control. En ellos se observa que la presencia de BPA causa una reducción del contenido de este pigmento fotosintético, si bien, dicha inhibición solo es significativa ($p < 0,05$) en los cultivos expuestos a la concentración de 60 mg L^{-1} de BPA, donde se obtiene un valor del $11,23 \pm 4,88\%$ con respecto a la muestra control.

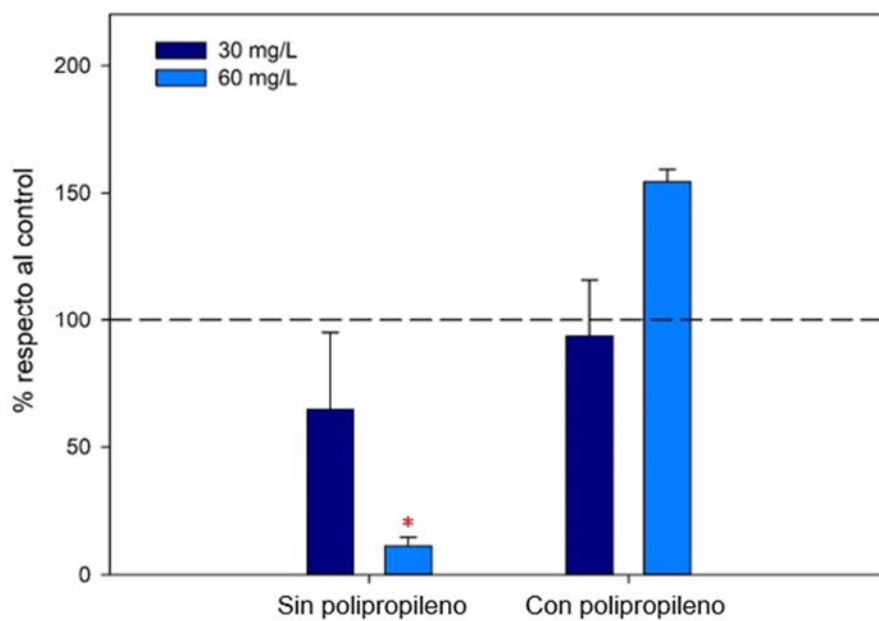


Figura 7. Contenido celular de clorofila *a* tras 72 horas de exposición a BPA. Los datos mostrados corresponden con los valores medios y las desviaciones estándar. La línea punteada refleja el valor de la muestra control y, los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de los tratamientos frente al control.

En resumen, la exposición a BPA provoca un efecto inhibitorio sobre todos los parámetros estudiados y además de manera dependiente de la concentración de aditivo en el medio, de modo que cuánto mayor es la concentración del contaminante, mayor inhibición presenta el parámetro estudiado en los cultivos de *C. reinhardtii*. Estos resultados sugieren que la exposición a BPA puede implicar un riesgo para esta microalga en los ecosistemas acuáticos.

4.2. Estudio de la potencial interacción toxicológica entre el BPA y los microplásticos de PP sobre *C. reinhardtii*

En este segundo ensayo, se estudió la potencial interacción entre efecto tóxico del bisfenol A y la presencia de microplásticos de polipropileno en el medio de cultivo de la microalga *C. reinhardtii*. En primer lugar, cabe destacar que la presencia de microplásticos de PP, en ausencia de BPA en el medio, no afectó a ninguno de los tres parámetros estudiados en el presente trabajo, dado que no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores obtenidos en los cultivos control con metanol pero sin microplásticos, y en los cultivos control con metanol y con un 1% (p/v) de microplásticos de PP (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos muestran que, en presencia de microplásticos de PP, el efecto tóxico de la exposición a BPA sobre la microalga descrito en la anterior sección disminuye notablemente, pues tal como se observan en las Figuras 4, 5 y 6, ninguna de las dos concentraciones de contaminante ensayadas ha causado diferencias significativas ($p > 0,05$) en los valores obtenidos para los parámetros analizados con respecto a los valores de los cultivos control.

Con el fin de analizar estadísticamente si existe interacción entre la presencia de microplásticos de PP y el efecto tóxico observado de las concentraciones de BPA sobre la microalga *C. reinhardtii*, se realizó un ANOVA de dos factores, tal y como se describe en la sección de Material y Métodos. El resultado de este contraste de hipótesis fue significativo para los tres parámetros estudiados, de crecimiento, de viabilidad celular y de contenido celular de clorofila *a*, pues el p -valor obtenido de la interacción entre ambas condiciones ha sido menor que el nivel de significación establecido ($\alpha = 0,05$). Estos resultados indican que el efecto tóxico del BPA en *C. reinhardtii* depende de la presencia de microplásticos de PP en el medio, sugiriendo además la existencia de un efecto de tipo antagónico entre ambos contaminantes. Por consiguiente, estos datos avalan la importancia de realizar estudios de toxicidad en función de la interacción entre varias variables, como son las analizadas en este trabajo, la exposición al BPA y la presencia de microplásticos.

5. Discusión

Existen numerosos estudios que sugieren que la presencia de bisfenol A en medios acuáticos puede ser perjudicial para los organismos que se encuentran en él, como microorganismos, plantas, animales invertebrados o vertebrados (Kang *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Thi *et al.*, 2016). Li *et al.* (2009) observaron que concentraciones de BPA menores a $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ no tenían efectos en el crecimiento de la diatomea *Stephanodiscus hantzschii*, pero conforme la concentración de contaminante aumentaba en el medio disminuía gradualmente la densidad celular. También observaron que cuando las células microalgales eran expuestas a concentraciones de BPA superiores a 5 mg L^{-1} , experimentaban ciertos cambios estructurales, como por ejemplo que la pared celular se desestructuraba, los orgánulos celulares no se organizaban correctamente y las células perdían gradualmente su color, lo que indicaba la desintegración de las membranas del cloroplasto y la pérdida de clorofila. En el presente estudio, las células de *C. reinhardtii* fueron expuestas a altas concentraciones de BPA, 30 y 60 mg L^{-1} , a las cuales se registró una reducción significativa del crecimiento celular (Figura 5). Además, se observó también una reducción en el contenido de clorofila *a* (Figura 7) que sugeriría la existencia de importantes alteraciones del metabolismo fotosintético de la microalga. Estos resultados reiteran la potencial toxicidad que el BPA puede ejercer en los medios acuáticos, pues la presencia de este en el medio de cultivo de *C. reinhardtii* provocó una inhibición de todos los parámetros analizados, de modo que la concentración de bisfenol A más alta ensayada causó que los valores de los parámetros estudiados se aproximasen a cero.

Interesantemente, en el estudio del potencial efecto tóxico del BPA sobre la viabilidad celular de *C. reinhardtii*, se observa que con 30 mg L^{-1} de contaminante en el medio, este parámetro se mantuvo con valores próximos al $100 \pm 0\%$ (Figura 6). Algunos autores han relacionado esta ausencia de efecto tóxico a concentraciones relativamente bajas, con la capacidad de las microalgas de degradar el contaminante BPA presente en el medio. Los mecanismos de biodegradación variarían mucho según la especie, implicando distintas rutas metabólicas y produciendo distintos metabolitos. Por ejemplo, Li *et al.* (2009) demostraron que *Stephanodiscus hantzschii* eliminaba el BPA mediante biodegradación, si bien esta capacidad biodegradativa disminuía conforme aumentaba la concentración de contaminante en el medio. Estos ensayos indicaron que la biodegradación está ligada a la fase de crecimiento microalgal, siendo más dinámica durante el crecimiento exponencial de los cultivos. Estos autores comprobaron que tanto el crecimiento de la microalga utilizada en su trabajo, como la biodegradación del contaminante, se inhibían a concentraciones altas de BPA, momento en que las células perdían también su viabilidad, lo cual estaría en concordancia con lo observado en este trabajo.

En cuanto al estudio de la toxicidad de los microplásticos, Zhang *et al.* (2017) demostraron que la presencia de mPVC afectaba al contenido de clorofilas de *Skeletonema costatum*, con lo que disminuía también la actividad fotosintética.

Igualmente, en este trabajo se sugiere que uno de los efectos perjudiciales ejercido por los microplásticos sobre las microalgas reside en el llamado ‘efecto sombra’, es decir, en el bloqueo parcial de la entrada de luz a los cultivos, que acabaría afectando al desarrollo de la fotosíntesis. Sin embargo, Lagarde *et al.* (2016) comprobaron que el crecimiento de *C. reinhardtii* no se ve afectado por la presencia de altas concentraciones de microplásticos de polipropileno durante los primeros días de contacto, lo que concuerda con lo observado en este trabajo, donde ninguno de los tres parámetros analizados en esta especie microalgal se vio afectado por la presencia de microplásticos de PP en ensayos de 72 horas de duración.

Por otro lado, diversos autores han descrito que los microplásticos pueden adsorber con gran eficiencia diferentes contaminantes ambientales. Los resultados obtenidos en este estudio, muestran una interacción entre los microplásticos de PP y el aditivo BPA, de modo que la presencia de PP en el medio disminuiría el efecto tóxico de este contaminante emergente sobre *C. reinhardtii*, explicando que el crecimiento de los cultivos (Figura 5), la viabilidad celular (Figura 6) y el contenido en clorofila *a* (Figura 7) de esta microalga presenten valores próximos a los de sus respectivos controles. Se ha demostrado que polímeros como el polipropileno tienen una alta capacidad de adsorción de compuestos, como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), hexaclorociclohexanos, bencenos clorados, aditivos, etc. (Avio *et al.*, 2017). Esta capacidad de adsorción está influenciada por las propiedades del propio material plástico (por ejemplo, tamaño, tipo de polímero, forma) y de los contaminantes. Es por esto que los microplásticos se consideran vectores de contaminación para organismos acuáticos, especialmente en aquellos organismos que los ingieren (Bakir *et al.*, 2014). Tal y como se ha observado en este trabajo, los microplásticos pueden interactuar con contaminantes del medio y modular los efectos tóxicos de los mismos. A pesar de que no se conoce completamente el mecanismo por el cual los microplásticos adsorben contaminantes presentes en el medio y posteriormente los liberan, Bakir *et al.* (2014), demostraron que microplásticos de PE eran capaces de adsorber fenantreno, un hidrocarburo aromático policíclico (HAP). En la misma línea, Rehse *et al.* (2018) describieron que la adsorción del mismo aditivo empleado en este estudio, el BPA, por parte de microplásticos de poliamida (PA) condujo a una reducción del 25% de contaminante en agua. Dado que en este trabajo los microplásticos de PP eliminaron los efectos tóxicos de las concentraciones ensayadas del contaminante BPA sobre *C. reinhardtii*, estos datos tomados en su conjunto sugieren que la presencia de polipropileno ha podido reducir la disponibilidad de BPA en el medio de cultivo en base a una potencial capacidad de adsorción de este aditivo. En base a esto, sería interesante en futuros ensayos realizar cuantificaciones analíticas de la concentración de BPA en el medio de cultivo en ausencia y presencia de PP, para confirmar si realmente se produce un secuestro de este aditivo en los microplásticos.

6. Conclusiones

Conclusiones

La exposición de *Chlamydomonas reinhardtii* al contaminante bisfenol A provoca un efecto tóxico dependiente de la concentración de BPA en el medio. Esta toxicidad se ve reflejada en la inhibición de los tres parámetros estudiados: crecimiento de los cultivos, viabilidad celular y contenido celular de clorofila *a*.

Asimismo, la presencia singular de microplásticos de polipropileno en el medio de cultivo no ejerce ningún efecto perjudicial en dichos parámetros de la microalga dulceacuícola.

Por último, la presencia de microplásticos de PP modula los efectos tóxicos del contaminante BPA, de manera que este no produce alteraciones en ninguno de los parámetros estudiados en *C. reinhardtii* cuando ambos contaminantes se encuentran en el medio. Esto sugiere una interacción antagónica donde la presencia de microplásticos de PP anula el efecto tóxico del BPA.

Conclusión

A exposición de *Chlamydomonas reinhardtii* ao contaminante bisfenol A ten un efecto tóxico dependente da concentración de BPA do medio. Esta toxicidade reflíctese na inhibición dos tres parámetros estudados: o crecemento dos cultivos, a viabilidade celular e o contido celular de clorofila *a*.

Ademais, a presenza única de microplásticos de polipropileno no medio de cultivo non exerce ningún efecto prexudicial sobre os parámetros analizados da microalga.

Finalmente, a presenza de microplásticos de PP modula os efectos tóxicos do contaminante BPA, de xeito que non produce alteracións nos parámetros estudados en *C. reinhardtii* cando ambos contaminantes atópanse no medio. Isto suxire unha interacción antagónica onde a presenza de microplásticos de PP anula o efecto tóxico do BPA.

Conclusions

It has been proved that the exposure of *Chlamydomonas reinhardtii* to bisphenol A has a cytotoxic effect depending on the concentration of BPA in the medium. This toxicity is reflected in the inhibition of the three studied parameters: culture growth, cellular viability and cellular content of chlorophyll *a*.

Moreover, it has also been proved that the single presence of polypropylene microplastics in the medium does not involve any harmful effect in the studied parameters.

Finally, the toxic effects produced by the BPA pollutant can be modulated by the presence of PP microplastics; thus, BPA does not trigger any alteration of the studied parameters in *C. reinhardtii* under the presence of these two pollutants. This fact suggests an antagonistic interaction where the toxic effect of BPA is nullified by the presence of PP.

7. Bibliografía

- Anderson, J., Park, B., & Palace, V. (2016). Microplastics in aquatic environments: Implications for Canadian ecosystems. *Environmental Pollution*, 218: 269-280.
- Avio, C., Gorbi, S., & Regoli, F. (2017). Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. *Marine Environmental Research*, 128: 2-11.
- Bakir, A., Rowland, S., & Thompson, R. (2014). Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions. *Environmental Pollution*, 185: 16-23.
- Bold, H., & Wynne, M. (1985). Introduction to the Algae: structure and reproduction (2nd Ed). Englewood Cliffs, N.J: Prentice Hall.
- Day, J., Benson, E. & Fleck, R. (1999). In vitro culture and conservation of microalgae: Applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 35 (2): 127-136.
- De Almeida, A., Petersen, K., Langford, K., Thomas, K., & Tollefsen, K. (2017). Mixture toxicity of five biocides with dissimilar modes of action on the growth and photosystem II efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80 (16-18): 971-986.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J., Giudice, L., Hauser, R., Prins, G., Soto, A., Zoeller, R., & Gore, A. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*, 30 (4): 293-342.
- Dodds, E., & Lawson, W. (1936). Synthetic strogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature*, 137: 996.
- Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., & Cid, Á. (2016). Early alterations on photosynthesis-related parameters in *Chlamydomonas reinhardtii* cells exposed to atrazine: A multiple approach study. *Science of the Total Environment*, 554-555: 237-245.
- European Chemicals Agency (ECHA), consultado 13 febrero 2020: <https://echa.europa.eu/es/hot-topics/microplastics>
- FitzGerald, R., & Wilks, M. (2014). Bisphenol A-Why an adverse outcome pathway framework needs to be applied. *Toxicology Letters*, 230 (2): 368-374.
- García, A., Gallego, C., & Font, G. (2015). Toxicidad del Bisfenol A: Revisión. *Revista de Toxicología*, 32: 144-160.

- Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., & Fava, F. (2015). Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology*, 32 (1): 147-156.
- Harris, E. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual review of plant biology*, 52(1): 363-406.
- Jeanneret, R., Contino, M., & Polin, M. (2016). A brief introduction to the model microswimmer *Chlamydomonas reinhardtii*. *The European Physical Journal Special Topics*, 225: 2141-2156.
- Jeffrey, S., & Humphrey, G. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und physiologie der pflanzen*, 167 (2): 191-194.
- Kang, J., Aasi, D., & Katayama, Y. (2007). Bisphenol A in the Aquatic Environment and Its Endocrine-Disruptive Effects on Aquatic Organisms. *Critical Reviews in Toxicology*, 37 (7): 607-625.
- Lagarde, F., Olivier, O., Zanella, M., Daniel, P., Hiard, S., & Caruso, A. (2016). Microplastic interactions with freshwater microalgae: Hetero-aggregation and changes in plastic density appear strongly dependent on polymer type. *Environmental Pollution*, 215: 331-339.
- Li, R., Chen, G., Tam, N., Luan, T., Shin, P., Cheung, S., & Liu, Y. (2009). Toxicity of bisphenol A and its bioaccumulation and removal by a marine microalga *Stephanodiscus hantzschii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (2): 321-328.
- Maddah, H. (2016). Polypropylene as a Promising Plastic: A Review. *American Journal of Polymer Science*, 6 (1): 1-11.
- Matamoros, V., Gutiérrez, R., Ferrer, I., García, J., & Bayona, J. (2015). Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study. *Journal of Hazardous Materials*, 288: 34-42.
- Merchant, S., Prochnik, S., Vallon, O., Harris, E., Karpowicz, S., Witman, G., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W., Qu, L., Nelson, D., Sanderfoot, A., Spalding, M., Kapitonov, V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S., Grimwood, J., Schmutz, J., Grigoriev, I., Rokhsar, D., & Grossman, A. (2007). The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science*, 318 (5848): 245-250.
- Plastics Europe: Plastics - The Facts 2019, consultado 13 noviembre 2019: <https://www.plasticseurope.org/es/resources/publications/1804-plastics-facts-2019>

- Rehse, S., Kloas, W., & Zarfl, C. (2018). Microplastics Reduce Short-Term Effects of Environmental Contaminants. Part I: Effects of Bisphenol A on Freshwater Zooplankton Are Lower in Presence of Polyamide Particles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15 (2): 280.
- Schnurer, J. & Rosswall, T. (1982). Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter. *Applied and Environmental Microbiology*, 43 (6): 1256-1261.
- SCIEX, consultado 15 noviembre 2019: [https://sciex.com/applications/environmental-testing/contaminants-of-emerging-concern/pharmaceuticals-and-personal-care-products-\(ppcp\)](https://sciex.com/applications/environmental-testing/contaminants-of-emerging-concern/pharmaceuticals-and-personal-care-products-(ppcp))
- Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., & Cid, Á. (2014). Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. *Marine Environmental Research*, 101 (1): 1-7.
- Staples, C., Dorn, P., Klecka, G., O'Block, S., & Harris, L. (1998). A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, 36 (10): 2149-2173.
- Thi, M., Kim, N., Lan, C., & Phi, N. (2016). Acute Toxicity of Bisphenol A Induced Phenotypic Changes on Zebrafish (*Danio rerio*) During Early Development. *Journal of Science and Technology*, 54 (2A): 71-77.
- United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO), consultado 17 febrero 2020: <https://en.unesco.org/emergingpollutantsinwaterandwastewater>
- United States Environmental Protection Agency (EPA US), consultado 18 noviembre 2019: <https://www.epa.gov/national-aquatic-resource-surveys/ncca>
- Wang, J., Zhang, X., Chen, Y., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2008). Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere*, 73 (7): 1121-1128.
- Wu, P., Cai, Z., Jin, H., & Tang, Y. (2019). Adsorption mechanisms of five bisphenol analogues on PVC microplastics. *Science of the Total Environment*, 650: 671-678.
- Zhang, C., Chen, X., Wang, J., & Tan, L. (2017). Toxic effects of microplastic on marine microalgae *Skeletonema costatum*: Interactions between microplastic and algae. *Environmental Pollution*, 220: 1282-1288.

Abreviaturas

ANOVA	Análisis de la varianza
BPA	Bisfenol A
DE	Disruptor endocrino
EC₅₀	Concentración efectiva media
EPA	Agencia de Protección Medioambiental
FDA	Diacetato de fluoresceína
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PA	Poliamida
PBDE	Polibromo difenil éteres
PE	Polietileno
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PVC	Policloruro de vinilo
TAP	Trisacetato fosfato