

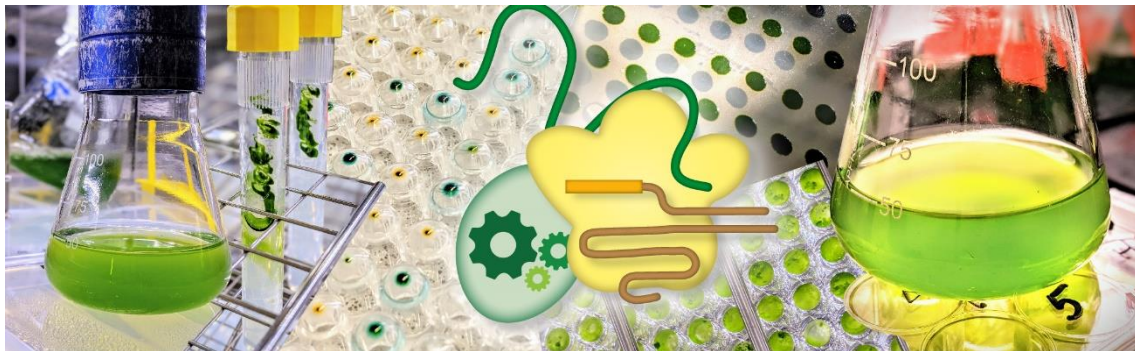
# Grado en Biología

## Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Toxicidad ejercida por contaminantes acuáticos sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii***

**Toxicidade exercida por contaminantes acuáticos sobre a microalga doceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii***

**Toxicity provoked by aquatic pollutants on the freshwater microalga *Chlamydomonas reinhardtii***



Jennifer Cristina Vigo Rodríguez

Curso: 2019 – 2020; Convocatoria: Junio

Dirigido por la Dra María Ángeles Cid Blanco y Marta Seoane Méndez



# ÍNDICE

Resumen/Resumo/Abstract.....	4
1. Introducción .....	7
2. Objetivo.....	9
3. Material y métodos .....	10
3.1. Descripción de la especie .....	10
3.2. Cultivo microalgal .....	11
3.3. Bisfenol A .....	12
3.4. Bisfenol S .....	13
3.5. Diseño experimental.....	14
3.6. Determinación de la densidad celular .....	14
3.7. Análisis de la actividad celular .....	15
3.8. Análisis mediante fluorimetría de modulación de amplitud de pulso ..	16
3.9. Determinación espectrofotométrica de los pigmentos.....	16
3.10. Análisis estadístico.....	17
4. Resultados y discusión .....	18
4.1. Densidad celular .....	18
4.2. Actividad celular .....	20
4.3. Fluorimetría de modulación de amplitud de pulso.....	23
4.4. Determinación de pigmentos fotosintéticos.....	24
5. Conclusiones/Conclusiónes/Conclusions .....	28
6. Bibliografía.....	30
7. Abreviaturas.....	33
8. Índice de figuras .....	34
9. Índice de tablas.....	34

## Resumen

El avance que está experimentando la ciencia en la actualidad, permite el desarrollo de nuevas técnicas mediante las cuales se puede observar la presencia de un gran número de contaminantes emergentes en el medio acuático. La presencia de estos contaminantes en el agua supone un grave peligro para el funcionamiento de los ecosistemas, ya que estos atacarían en primer lugar a las microalgas, las cuales forman parte del fitoplancton y, por lo tanto, constituyen la base de los ecosistemas. Estos contaminantes pueden transferirse por la cadena trófica llegando a causar importantes alteraciones en el funcionamiento del ser humano.

En el presente trabajo se estudió el posible efecto tóxico de los microcontaminantes emergentes Bisfenol A (BP-A) y Bisfenol S (BP-S) sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii*. Los cultivos de *C. reinhardtii* se expusieron a dos concentraciones tanto de BP-A, como de BP-S (20 mg L<sup>-1</sup>; y 40 mg L<sup>-1</sup>) durante 96 h y se analizaron los parámetros de densidad celular, actividad celular y actividad fotosintética mediante dos vías: contenido en pigmentos (clorofila *a* y *b* y carotenoides) y por fluorimetría de modulación de amplitud de pulso (PAM) frente a cultivos control sin contaminante.

En este estudio comparativo entre los microcontaminantes emergentes BP-A y BP-S sobre la microalga *C. reinhardtii*, se observó un mayor efecto tóxico del BP-S, puesto que para todos los parámetros analizados el BP-S mostró diferencias significativas (p-valor < 0,05) entre el tratamiento a una concentración de 40 mg L<sup>-1</sup> y el control, en alguna de las horas ensayadas (24, 72 ó 96 h). Sin embargo, el BP-A solo provocó una inhibición significativa (p-valor < 0,05) en cuanto a la densidad celular a las 72 y 96 h; además de una disminución significativa (p-valor < 0,05) del contenido en clorofila *a* y carotenoides a las 24 h.

**Palabras clave:** *Chlamydomonas reinhardtii*, Bisfenol A, Bisfenol S, densidad celular, actividad celular, actividad fotosintética.

## Resumo

O avance que está a experimentar a ciencia na actualidade, permite desenvolver novas técnicas mediante as cales pódese observar a presenza dun gran número de contaminantes emerxentes no medio acuático. A presenza destes contaminantes na auga supón un grave perigo para o funcionamento dos ecosistemas, xa que estes atacarían en primeiro lugar ás microalgas, as cales forman parte do fitoplancto e, polo tanto, constitúen a base dos ecosistemas. Estes contaminantes poden transferirse pola cadea trófica chegando a causar importantes alteracións no funcionamento de ser humano.

No presente traballo estúdiouse o posible efecto tóxico dos microcontaminantes emerxentes Bisfenol A (BP-A) e Bisfenol S (BP-S) sobre a microalga doceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii*. Os cultivos de *C. Reinhardtii* expuxéronse a dúas concentracións tanto de BP-A, como de BP-S (20 mg L<sup>-1</sup>; e 40 mg L<sup>-1</sup>) durante 96 h e analizáronse os parámetros de densidade celular, actividade celular e actividade fotosintética mediante dúas vías: contido en pigmentos (clorofila *a* e *b* e carotenos) e por fluorimetría de modulación de amplitude de pulso (PAM) fronte a cultivos control sen contaminante.

Neste estudio comparativo entre os microcontaminantes emerxentes BP-A e BP-S sobre a microalga *C. Reinhardtii*, observouse un maior efecto tóxico do BP-S, posto que para todos os parámetros analizados o BP-S mostrou diferencias significativas (p-valor < 0,05) entre o tratamento a unha concentración de 40 mg L<sup>-1</sup> e o control, nalgunha das horas ensaiadas (24, 72 ou 96 h). Sen embargo, o BP-A soamente provocou inhibición significativa (p-valor < 0,05) para a densidade celular ás 72 e 96 h; ademais dunha diminución significativa (p-valor < 0,05) do contido en clorofila *a* e carotenos ás 24 h.

Palabras clave: *Chlamydomonas reinhardtii*, Bisfenol A, Bisfenol S, densidade celular, actividade celular, actividade fotosintética.

## Abstract

The advance that science is currently experiencing allows the development of new techniques by which the presence of a large number of emerging pollutants in the aquatic environment can be observed. The presence of these pollutants in water poses a serious danger to the functioning of ecosystems, since they would firstly attack microalgae in the first place, which are part of phytoplankton and, therefore, form the basis of ecosystems. These pollutants can be transferred through the food chain, causing significant alterations in human functioning.

In the present work, the possible toxic effect of the emerging microcontaminants Bisphenol A (BP-A) and Bisphenol S (BP-S) on the freshwater microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* was studied. *C. reinhardtii* cultures were exposed to two concentrations of both BP-A and BP-S (20 mg L<sup>-1</sup>; and 40 mg L<sup>-1</sup>) for 96 h and the parameters of cell density, cell activity and Photosynthetic activity by two routes: pigment content (chlorophyll a and b and carotenoids) and by pulse width modulation fluorimetry (MAP) against control cultures without contaminant.

In this comparative study between the emerging BP-A and BP-S microcontaminants on the microalgae *C. reinhardtii*, a greater toxic effect of the BP-S was observed, since for all the parameters analyzed the BP-S showed significant differences (p-value <0.05) between the treatment at a concentration of 40 mg L<sup>-1</sup> and the control, in any of the hours tested (24, 72 or 96 h). However, BP-A only caused significant inhibition (p-value <0.05) in terms of cell density at 72 and 96 h; in addition to a significant decrease (p-value <0.05) in the content of chlorophyll a and carotenoids at 24 h.

**Key words:** *Chlamydomonas reinhardtii*, Bisphenol A, Bisphenol S, cell density, cell activity, photosynthetic activity.

## 1. Introducción

El agua es un recurso natural que en los últimos años está pasando a ser escaso, sin embargo, es indispensable para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente (Barceló y López de Alda, 2008). El avance de la industrialización ha conllevado un importante incremento en la cantidad de compuestos químicos liberados al medio ambiente, provocando, por lo tanto, el deterioro de las cualidades del agua, así como el aumento de sustancias peligrosas disueltas en ella (Patiño, Díaz y Ordoñez, 2014). De hecho, el desarrollo de nuevos métodos analíticos ha podido poner de manifiesto la presencia de contaminantes hasta el momento desconocidos que podrían conllevar efectos adversos para el medio ambiente. Estos últimos se conocen como contaminantes emergentes (Barceló et al., 2008).

Los contaminantes emergentes se utilizan diariamente en grandes cantidades e incluyen una amplia variedad de compuestos tales como productos farmacéuticos, productos de cuidado personales, desinfectantes, surfactantes y algunos pesticidas (Matamoros, Uggetti, García y Bayona, 2016). El principal problema de los contaminantes emergentes es que no se pueden eliminar en las plantas de tratamiento de aguas por lo que pasan a estar presentes tanto en ríos como en fuentes de abastecimiento (Peña y Castillo, 2015). Por otra parte, no se encuentran regulados por los reglamentos de calidad de aguas existentes actualmente, pudiendo ser una amenaza potencial tanto para los ecosistemas como para la salud y seguridad humana (La Farre, Pérez, Kantiani y Barceló, 2008). Esto, puede causar alteraciones endocrinas (e.g. pesticidas o productos farmacéuticos), afectar a la actividad estrogénica (e.g. detergentes y los plásticos), y modificar el desarrollo reproductivo en animales mamíferos... (Becerril, 2009).

En la industria, los elementos plastificantes como el bisfenol A (BP-A) se emplean para aumentar la flexibilidad de los plásticos. Sin embargo, hay estudios que demuestran que dichos compuestos presentan efectos perjudiciales para la salud humana, pudiendo actuar como disruptor endocrino (Sauvé y Desrosiers, 2014). En la actualidad su uso se encuentra, por lo tanto, prohibido en ciertos sectores como, por ejemplo, en la elaboración de

productos para niños. De acuerdo con eso, el BP-A se vio poco a poco sustituido por el Bisfenol S (BP-S). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que este compuesto también podría ser un elemento tóxico para el medio ambiente, debido a su baja tasa de biodegradabilidad, además de que puede acarrear efectos estrogénicos en humanos (Tadeu, Coutinho, Salomao y Marques, 2019).

Las algas son organismos fotosintéticos que crecen en múltiples hábitats acuáticos, incluyendo lagos, ríos, océanos y aguas residuales. Estas últimas presentan una gran tolerancia en cuanto a temperaturas, salinidad, pH e intensidad de luz. El orden Algae se encuentra ampliamente clasificado en cuatro divisiones: Rhodophyta (algas rojas), Phaeophyta (algas pardas) y Chlorophyta (algas verdes); que se clasifican a su vez según su tamaño en macroalgas y microalgas. Las microalgas son microorganismos que se caracterizan por presentar pigmentos fotosintéticos como la clorofila a, que les permite llevar a cabo la fotosíntesis, así como lípidos, proteínas y carbohidratos cuya concentración puede variar dependiendo del cultivo. El uso de las algas en los bioensayos es de gran importancia, porque son productores primarios, por lo que se encuentran en la base de la cadena trófica, constituyendo uno de los pilares para mantener el equilibrio de los ecosistemas; además estas pueden representar un peligro para el ecosistema por su capacidad de acumulación y transmisión en la red trófica (Esperanza, Seoane, Servia y Cid, 2020). El interés por las microalgas se debe a su amplio abanico de aplicaciones entre las que destacan: su uso en el tratamiento de aguas residuales, su aplicación en la medicina y farmacología, su presencia en la industria química y alimenticia y su empleo como método alternativo a los combustibles fósiles... (Luna, 2007).



## 2. Objetivo

El objetivo de este trabajo es evaluar la toxicidad ejercida por los microcontaminantes emergentes bisfenol A (BP-A) y bisfenol S (BP-S), a distintas concentraciones, sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii*. En este estudio, el efecto tóxico de estos compuestos se determina en función de la respuesta celular a tres niveles: 1) el crecimiento poblacional, determinado como la variación de la densidad celular de los cultivos, 2) la actividad celular, en base a un ensayo de hidrólisis enzimática del FDA, y 3) la actividad fotosintética, determinada por dos vías que son la determinación del contenido celular de pigmentos (clorofilas *a* y *b*, carotenoides) y por fluorimetría de modulación de amplitud de pulso (PAM).

### 3. Material y métodos

#### 3.1. Descripción de la especie

La especie utilizada en el presente trabajo es la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard. La cepa utilizada (CCAP 11/32A mt+) se ha obtenido de la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos del Laboratorio Marino de Dunstaffnage, en Escocia (Reino Unido). *C. reinhardtii* pertenece a la división *Chlorophyta*, a la clase *Chlorophyceae* y al orden *Volvocales*.

*C. reinhardtii* es un alga verde unicelular dulceacuícola cuyas células presentan diversidad tanto en la forma, como en el tamaño; en cuanto a la forma pueden ser ovoides, elipsoidales o esféricas, en relación con el tamaño varía entre 9 y 12µm para la longitud y entre 4 y 8µm para el diámetro (Harris, 2009).

Las células de *C. reinhardtii* están rodeadas de una pared celular formada por glicoproteínas fibrosas y en la cual se diferencian tres capas; esta pared es continua exceptuando la zona apical en la cual se proyectan dos flagelos. Estas células también están compuestas por un cloroplasto con forma de copa, el cual puede presentar pirenoides y una mancha ocular alargada. El núcleo, por su parte, está envuelto por el aparato de Golgi y este a su vez por un sáculo de retículo endoplasmático que sirve de enlace con la membrana plasmática. Las mitocondrias se sitúan entre el cloroplasto y el plasmalema, mientras que las dos vacuolas contráctiles se encuentran en la región anterior de la célula (Harris, 2009).

Dos características (además de las mencionadas en la introducción) que hacen de *Chlamydomonas* una especie importante para estudios moleculares y celulares son, por un lado, que se encuentra bien caracterizada genéticamente presentando tres genomas (nuclear, cloroplasto y mitocondrial) secuenciado (Rasala y Mayfield, 2011). Por otro lado, que si se añade al medio de cultivo una fuente de carbono, su función fotosintética se hace prescindible (Rochaix, 1995).

Las microalgas son organismos que presentan tanto reproducción sexual como asexual la cual tiene lugar mediante división longitudinal del protoplasto, teniendo lugar dos divisiones celulares sucesivas que generan cuatro células

hijas, como se recoge en el trabajo de Esperanza (2017). En este trabajo se utilizaron células de tipo mt+ para evitar la reproducción sexual.

*C. reinhardtii* es una microalga empleada en un amplio abanico de investigaciones biológicas por su haploidía, su facilidad de cultivo, su rápido crecimiento y su forma de reproducción que puede ser tanto sexual como asexual (Conde, 2016). Por lo tanto, por todo lo mencionado anteriormente se eligió esta especie para el estudio.

### **3.2. Cultivo microalgal**

Los cultivos del alga *C. reinhardtii* se realizaron en medio Tris-acetato-fosfato, también llamado TAP (*Tris-acetate-phosphate*) (Gorman y Levine, 1995; Harris, 2009) añadiendo algunas modificaciones, en concreto la ausencia de una fuente orgánica de carbono en el medio y la utilización de nitrato como fuente de nitrógeno.

La obtención del medio TAP se consiguió a partir de dos soluciones: el TAP de sales (macronutrientes) y una solución fosfato. Estas soluciones se esterilizaron en el autoclave a 120° C durante 20 min. Para obtener la solución de TAP se añaden: 4,9 g de Tris, 25 mL L<sup>-1</sup> de TAP de sales, 0,375 mL L<sup>-1</sup> de solución fosfato y se completó con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 2 L. Finalmente, se ajustó el pH a 7.0 con ácido clorhídrico al 37%.

Por otro lado, se preparó una solución de oligoelementos, la cual se realizó añadiendo 0,25 g de Algal en 50 mL de agua destilada y se esterilizó del mismo modo que las dos soluciones anteriores. De esta solución, en condiciones de esterilidad, se añadió al medio 3 mL L<sup>-1</sup>.

Los cultivos se llevaron a cabo en matraces Pyrex de 1 L y se mantuvieron en condiciones axénicas, sin aireación y en un agitador orbital, el cual los mantuvo en agitación constante a 150 r.p.m para evitar la sedimentación de las células y que se formasen gradientes de luz o nutrientes. Además, permanecieron en una cámara de temperatura controlada y constante a 20 ± 1°C y con una iluminación de 80 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> proporcionada por tubos fluorescentes Philips TLD de 36 W, aplicada con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Los experimentos se realizaron a partir de un inóculo en fase exponencial cuya densidad celular era de  $2 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>

### **3.3. Bisfenol A**

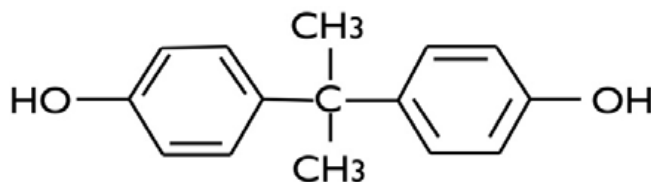
El bisfenol A (BP-A) o [4,4'-dihidroxi-2,2-difenilpropano] es un compuesto químico muy utilizado en la fabricación de plásticos.

Este último se forma gracias a la unión de dos anillos fenólicos mediada por un grupo acetona. El químico ruso, Aleksandr Dianin, fue el encargado de sintetizarlo por primera vez en 1891. Sin embargo, no fue hasta años más tarde que se pusieron de manifiesto sus efectos nocivos (García, Gallego y Font, 2015).

El BP-A se emplea en la síntesis de policarbonatos, resinas epoxi y papel térmico lo que conlleva que esté presente en productos que se usan a diario como juguetes, equipos electrónicos, tuberías de canalización del agua entre otros lugares. Además, también se emplea en la fabricación de distintos recipientes que están en contacto con alimentos o bebidas como pueden ser, por ejemplo, las botellas, los biberones, envases... (Michalowicz, 2014). Como consecuencia, dicho compuesto que está regulado por el Reglamento de la Unión Europea 10/2011 de la Comisión, de 14 enero de 2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. Sin embargo, a la vista de los efectos tóxicos que presenta sobre la salud humana actuando como disruptor endocrino o incluso pudiendo conllevar la carcinogénesis. En enero de 2011, la Comisión Europea adoptó la Directiva 2011/8/UE, que prohíbe el uso de BP-A en la fabricación de biberones (Juan-García, et al., 2015).

Otro problema relevante del BP-A, es que está siendo continuamente liberado al medio ambiente a través de la combustión de residuos domésticos y plásticos, de la descarga de aguas residuales urbanas, descarga de lodos..., provocando la contaminación del medio ambiente y, por tanto, de sistemas acuáticos, conllevando la aparición de efectos tóxicos en los organismos de este medio (Ji, Kabra, Choi, Hwang, Kim, Abou-Shanab, Oh y Jeon, 2014).

Por lo tanto, con el fin de estudiar la toxicidad del BP-A sobre la microalga *C. reinhardtii* en el presente estudio se ha empleado BP-A comercializado por Sigma-Aldrich con una pureza mayor del 95%.



**Figura 1.** Estructura química del Bisfenol A (Juan-García et al., 2015).

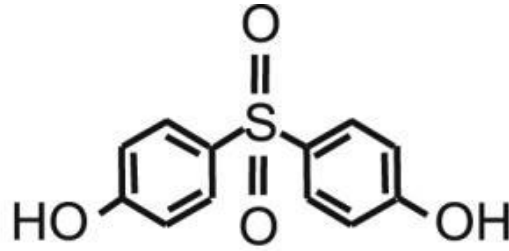
### 3.4. Bisfenol S

El Bisfenol S (BP-S) o (2,2-bis [4-hidroxifenol] sulfona) es un contaminante ubicuo, que interactúa con distintas especies de invertebrados pudiendo alterar, por lo tanto, las cadenas tróficas, conllevando una modificación del equilibrio natural de los ecosistemas, especialmente el de los ecosistemas acuáticos (Herrero, Aquilino, Sánchez y Planelló, 2018).

El uso del BP-S es muy diverso, es utilizado, por ejemplo, en la fabricación de papel térmico (el cual se comercializa como papel libre de BP-A), en aplicaciones industriales como agente de fijación de lavado o disolvente, así como en la elaboración de productos de uso diario, como productos de higiene personal y en alimentos (Tadeu, et al., 2019).

Actualmente, el uso del BP-S se ha disparado debido a la falta de regulación y por lo tanto de restricción en cuanto a su uso, en comparación con el BP-A que se encuentra altamente regulado y restringido. Además, cabe destacar, que el BP-S presenta una mayor estabilidad tanto frente al calor como a la luz solar. Sin embargo, la similitud química y estructural del BP-S con el BP-A y la falta de datos toxicológicos para el BP-S hacen desconfiar de que este compuesto sea un buen sustituto del BP-A (Eladak, Grisin, Moison, Guerquin, N'Tumba-Byn, Pozzi-Gaudin, Benachi, Livera, Rouiller-Fabre y Habert, 2015).

Por lo tanto, con el fin de estudiar la toxicidad del BP-S sobre la microalga *C. reinhardtii* en el presente estudio se ha empleado BP-S comercializado por Sigma-Aldrich con una pureza mayor del 95%.



**Figura 2.** Estructura química del Bisfenol S (Mokra, et al., 2018).

### 3.5. Diseño experimental

Con la finalidad de valorar los posibles efectos tóxicos del BP-A y BP-S en las células de *C. reinhardtii* se llevaron a cabo dos ensayos, con una duración de 96 h. En cada uno de los ensayos, las concentraciones testadas de ambos contaminantes fueron las mismas: 20 mg L<sup>-1</sup> y 40 mg L<sup>-1</sup>, además de cultivos control carentes de BP-A y BP-S.

Los cultivos se llevaron a cabo por triplicado en matraces Pyrex con 50 mL de cultivo y se preservaron en las mismas condiciones de fotoperiodo y de aireación que las especificadas para el cultivo *stock*.

Los análisis de los distintos parámetros se realizaron, por un lado, el recuento de células y la PAM a las 24, 72 y 96 h y, por otro lado, la actividad celular y el contenido celular en pigmentos solo se llevó a cabo a las 24 y 96 h.

### 3.6. Determinación de la densidad celular

La densidad celular se analizó diariamente mediante un recuento del número de células presentes en el cultivo. Para realizar el recuento, se tomó una alícuota de cada tratamiento y se les añadió un pequeño volumen de lugol con el fin de fijar las células evitando, de esta forma, errores en el recuento. Posteriormente, se llevó a cabo el recuento en una cámara Neubauer, utilizando un microscopio óptico de contraste de fases NIKON Eclipse E400.

Tras el recuento, se calculan las tasas de crecimiento ( $\mu$ ) empleado la siguiente fórmula:

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

Dónde:  $\mu$  es la tasa de crecimiento en días<sup>-1</sup>;  $N_t$ , la densidad celular (cél mL<sup>-1</sup>) tras 96 h en presencia del contaminante;  $N_0$ , la densidad celular para el

tiempo 0; y, t y  $t_0$  el tiempo inicial y tiempo final respectivamente expresados en días.

### 3.7. Análisis de la actividad celular

El análisis de actividad celular en los cultivos de *C. reinhardtii* se realizó a través de la hidrólisis enzimática del diacetato de fluoresceína (FDA o fluorescein diacetate).

El FDA está compuesto por dos grupos acetato unidos por una molécula central de fluoresceína. Este compuesto es un éster lipofílico, no polar y que no presenta fluorescencia. Tras su entrada en la célula y la acción de las esterasas citoplasmáticas, el FDA pierde los grupos acetato por hidrólisis de los enlaces éster. Como resultado se obtiene una molécula de fluoresceína libre, que se caracteriza por ser hidrofílica, polar y por emitir fluorescencia a longitudes de onda de 540 nm (espectro del verde) cuando se excita con luz azul.

La actividad celular, se midió a las 24 y 96 h de exposición a los contaminantes. El análisis se realizó tomando 5 mL de cada tratamiento incluido el control y se centrifugaron 10 min con el fin de recoger las células. Tras la centrifugación se resuspendieron las células en 5 mL de TNP y se dividió en 2 tubos ( $t_0$  y  $t_1$ ). A cada uno de los tubos se les añadió 12,5  $\mu\text{L}$  de FDA procedente de una solución stock de 2,5  $\text{mg mL}^{-1}$  obteniéndose, por lo tanto, una concentración final de FDA de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A continuación, se añadió 2,5 mL de acetona pura tanto al tubo ( $t_0$ ) como al tubo ( $t_1$ ), con la única diferencia de que al primero se le añadió inmediatamente después del FDA, mientras que, al otro tubo se le adicionó una hora más tarde. Por último, tras centrifugar (15 min; 400 r.p.m) ambos tubos en una centrífuga refrigerada Multifuge 3L-R Heraeus, se midió la absorbancia del sobrenadante a 490 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Shimadzu uv-1700; cogiendo como blanco la acetona pura.

Para normalizar los datos, se restaron los valores de absorbancia de los tubos  $t_0$  a los de los tubos  $t_1$ . Los valores obtenidos se llevaron, a continuación, a una recta de calibrado, cuya concentración de fluoresceína oscila entre 0,5 y 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (empleando una solución stock de fluoresceína de 2,5  $\text{mg mL}^{-1}$ ).

Finalmente, a partir de dicha curva, se calculó la concentración de fluoresceína presente en cada tubo, expresando los resultados en picogramos (pg) de fluoresceína partido de células por hora.

### **3.8. Análisis mediante fluorimetría de modulación de amplitud de pulso**

El análisis mediante fluorimetría de modulación de amplitud de pulso (PAM) permitió estudiar el estrés fisiológico, a nivel fotosintético, que sufren las células debido a la exposición al BP-A y BP-S.

Para realizar este análisis, se tomaron alícuotas de cada tratamiento incluido el control y se mantuvieron 30 min en oscuridad. Pasado este tiempo, y en condiciones de poca luminosidad, se realizaron las medidas de rendimiento fotosintético (QY) mediante el AquaPen-C-AP-C100 (Photon Systems Instruments).

### **3.9. Determinación espectrofotométrica de los pigmentos**

Para el análisis espectrofotométrico de los pigmentos de *C. reinhardtii*, se tomaron alícuotas de cada uno de los cultivos y se recogieron las células mediante centrifugación en una centrífuga refrigerada Multifuge 3L-R Heraeus a 4500 r.p.m a 4° C durante 20 min. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y la biomasa se resuspendió en 3 mL de acetona al 90%. Esta mezcla se mantuvo durante 24 h a 4°C y en oscuridad para conseguir la extracción completa de los pigmentos. Pasadas las 24 h, se realizó una nueva centrifugación y se recuperó el sobrenadante, lugar donde se concentraban los pigmentos extraídos. A este sobrenadante se le realizó lecturas de absorbancia a diferentes longitudes de onda (664, 647 y 480 nm), en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160<sup>a</sup>, utilizando como blanco acetona al 90%.

Las medidas de absorbancia obtenidas se transformaron a cantidad de clorofilas (*a* y *b*) y carotenoides según Jeffrey y Humphrey (Jeffrey y Humphrey, 1975) y Strickland y Parsons (Strickland y Parsons, 1972).

Para determinar espectrofotométricamente los pigmentos, se emplearon las siguientes ecuaciones:



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

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

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

Donde, [Clorofila *a*], [Clorofila *b*] y [Carotenoides totales] representan concentraciones de dichos pigmentos en  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de extracto y  $A_{664}$ ,  $A_{647}$  y  $A_{480}$  son las absorbancias medidas a 664, 647 y 480 nm.

Los resultados obtenidos se expresaron en  $\text{pg pigmento células}^{-1}$ .

### 3.10. Análisis estadístico

Para el análisis de los parámetros, lo primero que se hace es el cálculo de las medias y de los errores estándar para cada uno de los tratamientos incluido el control.

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el software IBM SPSS Statistic versión 25.0. Para cada experimento, se plantearon dos hipótesis nulas; (i) “la concentración de BP-A del medio no afecta al parámetro de estudio en la microalga *C. reinhardtii*”, (ii) “la concentración de BP-S del medio no afecta al parámetro de estudio en la microalga *C. reinhardtii*”.

Estas hipótesis se analizaron gracias a un análisis de varianza de una vía (ANOVA) a un nivel de confianza del 95%. En los casos, donde no se aceptó la hipótesis nula, se utilizó el test de rango múltiple de Tukey, para comprobar cómo afectaba la concentración de contaminante al parámetro de estudio. Esta prueba se aplicó con un nivel de significación de 0,05.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Densidad celular

Para estudiar la toxicidad que ejercen los contaminantes emergentes BP-A y BP-S sobre la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, uno de los parámetros estudiados fue la densidad celular. A pesar de los avances que está experimentando el campo de la ecotoxicología en la actualidad, la densidad celular y la tasa de crecimiento celular son parámetros que siguen vigentes para determinar la toxicología de determinados compuestos sobre microorganismos (Van Wezel y Van Vlaardingen, 2004).

A la vista de los resultados, la presencia de los contaminantes testados (BP-A y BP-S) condujeron a una disminución en el crecimiento celular de la microalga dulceacuícola *C. reinhardtii*, lo que se tradujo en una disminución en la densidad celular con respecto al tratamiento control. (Tabal 1, Figura 3).

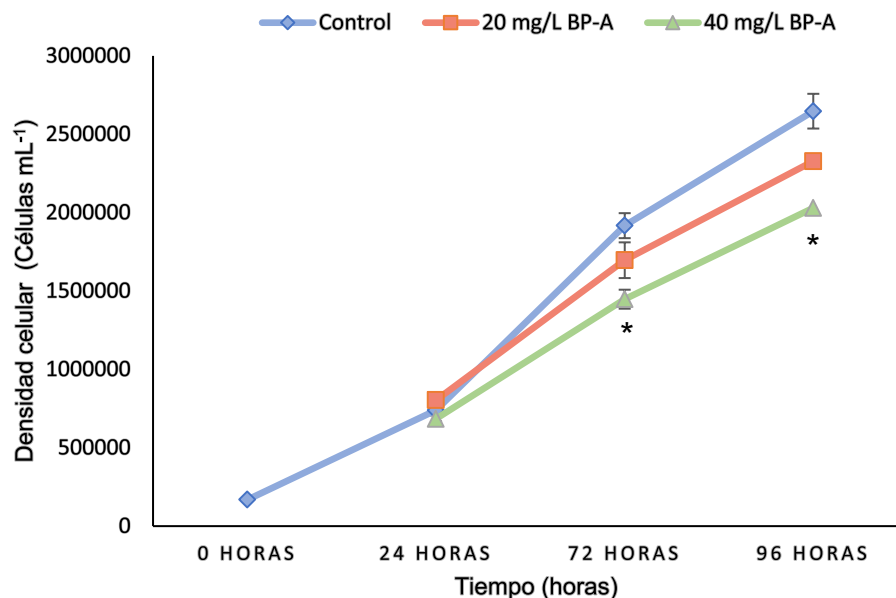
En efecto, centrándonos primero en el efecto del BP-S, se observó un descenso significativo de la densidad celular tras 24 h de exposición a una concentración de 40 mg L<sup>-1</sup>, obteniéndose un valor de densidad celular de 0,47 cél×10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> frente a 0,74 cél×10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> del control (p-valor < 0,05). Además, también se puso de manifiesto que el efecto tóxico de este contaminante se fue acentuando con el paso del tiempo; obteniéndose un efecto inhibitorio significativo (p-valor < 0,05) mayor en el crecimiento celular tras 96 h de exposición a todas las concentraciones testadas de BP-S. Para la concentración más pequeña de BP-S (20 mg L<sup>-1</sup>), el crecimiento se redujo en torno a un 20%, mientras que para la concentración más grande de BP-S (40 mg L<sup>-1</sup>) el crecimiento se redujo un 30%.

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos determinar que la tasa de crecimiento de *C. reinhardtii* es inversamente proporcional a la concentración de BP-S testada y que es la concentración de 40 mg L<sup>-1</sup> la que más influye en la densidad celular de *C. reinhardtii* (Tabla 1).

Contaminantes (mg L <sup>-1</sup> )	Densidad celular a las 24 h (cél×10 <sup>6</sup> mL <sup>-1</sup> )	Densidad celular a las 96 h (cél×10 <sup>6</sup> mL <sup>-1</sup> )
Control	0,74 ± 0,07	2,65 ± 0,11
20 BP-S	0,59 ± 0,04	2,19 ± 0,06
40 BP-S	0,47 ± 0,04	1,89 ± 0,02

**Tabla 1.** Densidad celular obtenida en los cultivos de *C. reinhardtii* tras 24 y 96 h de exposición a distintas concentraciones de BP-S ensayadas. Los valores representan la media de las tres réplicas y su correspondiente desviación estándar.

En cuanto al BP-A, también se observó un efecto inhibitorio en el crecimiento celular de la microalga *C. reinhardtii*. Sin embargo, dicha inhibición no fue significativa ( $p$ -valor < 0,05) hasta las 72 horas de exposición. De forma que, el crecimiento celular solo se vio afectado significativamente con la concentración más alta testada (40 mg L<sup>-1</sup>) siendo su densidad celular media de 2,03 cél×10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> frente a los 2,65 cél×10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> del control (Figura 3).



**Figura 3.** Curva de densidad celular de *C. reinhardtii* en presencia de distintas concentraciones de BP-A (mg L<sup>-1</sup>). Los valores representan la media de las tres réplicas y su correspondiente desviación estándar. Los asteriscos representan aquellos valores significativos con respecto al control ( $p$ -valor < 0,05).

La inhibición del crecimiento de la microalga dulceacuícola *C. reinhardtii* tras la exposición al BP-A ya se observó anteriormente en la literatura, corroborando los resultados obtenidos en este estudio. Se ha descrito que, a medida que se produce un aumento en la concentración de BP-A, se produce un descenso en la tasa de crecimiento, efecto que también se ha puesto de manifiesto en el presente estudio (Esperanza, et al., 2020). Dicho efecto inhibitorio, también se ha descrito en otros organismos como por ejemplo en el alga *Tetraselmis suecica*; en el estudio de Torres et colaboradores (2015), donde el efecto negativo del BP-A sobre el crecimiento de *T. suecica* se observó incluso a concentraciones más pequeñas que las testadas en este estudio (Torres, 2015). Por otra parte, en el trabajo de Lorenzo (2018) sobre *T. suecica* se ve una disminución del crecimiento provocada por la presencia del BP-A, pero también por la influencia de otros parámetros como puede ser la exposición a distintas temperaturas (Lorenzo, 2018).

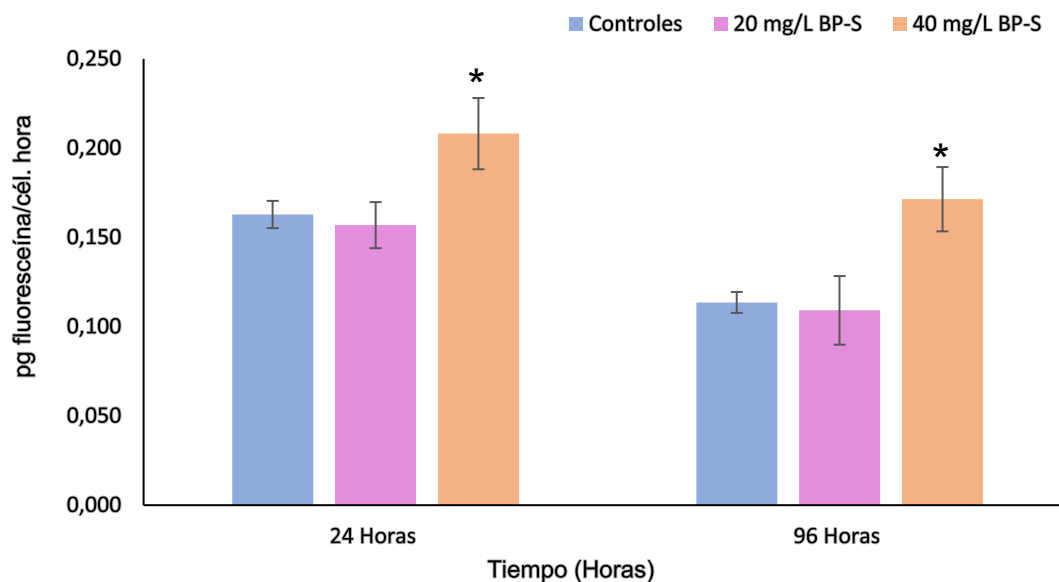
Por otra parte, la inhibición del crecimiento tras la exposición al BP-S, es un fenómeno que también se encuentra descrito en otros estudios. En el estudio de Viñas y Watson (2013) se ve como la combinación del BP-S con el estradiol ( $E_2$ ) en la línea celular hipofisaria de las ratas conllevó un descenso de la densidad celular con respecto al control (Viñas y Watson, 2013).

#### **4.2. Actividad celular**

En este trabajo, se realizó el estudio de actividad celular de *C. reinhardtii* mediante la hidrólisis enzimática del diacetato de fluoresceína (FDA). El análisis de la actividad enzimática inespecífica sobre las células nos permitió detectar con gran rapidez y fiabilidad la presencia de estrés en las mismas (Blaise y Ménard, 1998).

Los resultados obtenidos en este trabajo determinaron que solo la máxima concentración de BP-S ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ) indujo un aumento significativo en la actividad celular de *C. reinhardtii* ( $p\text{-valor} < 0,05$ ). La exposición de las células de *C. reinhardtii* durante 24 h al BP-S a una concentración de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  no mostró ningún efecto. Sin embargo, al aumentar la concentración de contaminante a  $40 \text{ mg L}^{-1}$  se observó un cambio en la actividad celular, que se tradujo en un aumento de la actividad. Esta tendencia se repitió a las 96 h. Por

otra parte, también se pudo observar una disminución en la concentración de fluoresceína tras la exposición a 40 mg L<sup>-1</sup> BP-S a las 96 horas con respecto a la misma concentración de contaminante a las 24 h (Figura 4).



**Figura 4.** Actividad celular en pg fluoresceína cél<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en los cultivos de *C. reinhardtii* expuestos a diferentes concentraciones de BP-S y a un control sin tratamiento. Los valores representan la media de las tres réplicas y su correspondiente desviación estándar. Los asteriscos representan aquellos valores significativos con respecto al control (p-valor < 0,05).

El BP-A, por su parte, no presentó efectos inhibitorios significativos para la actividad celular, ni a las 24 h ni a las 96 h para ambas concentraciones testadas (20 mg L<sup>-1</sup> y 40 mg L<sup>-1</sup>) (Tabla 2).

Contaminante (mg L <sup>-1</sup> )	Concentración de fluoresceína (pg fluoresceína cél <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) a las 24 h	Concentración de fluoresceína (pg fluoresceína cél <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) a las 96 h
Control	0,16 ± 0,01	0,11 ± 0,01
20 mg L <sup>-1</sup> BP-A	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01
40 mg L <sup>-1</sup> BP-A	0,14 ± 0,02	0,10 ± 0,02

**Tabla 2.** Concentración de fluoresceína en los cultivos de *C. reinhardtii* tras 24 y 96 h de exposición a distintas concentraciones de BP-A ensayadas. Los valores representan la media de las tres réplicas y su correspondiente desviación estándar.

A la vista de los resultados, se piensa que el aumento a las 24 h de la concentración de fluoresceína para el BP-S (40 mg L<sup>-1</sup>) se debe a una estimulación de la actividad como respuesta al estrés; los microorganismos se aceleran para intentar eliminar las sustancias tóxicas (hormesis), de hecho, a las 96 h, ya se puede observar un descenso en la concentración de fluoresceína.

Al contrario de lo que ocurre en este experimento, se puede ver en otros estudios que el BP-A afecta a la actividad celular de *C. reinhardtii*, provocando una disminución significativa en el número de células viables expuestas al BP-A con respecto a los cultivos control (Esperanza, et al. 2020). También, se encontraron otros estudios en los que el BP-A afecta a la actividad celular de

otras algas como por ejemplo *Nannochloropsis gaditana* (Pardo, 2015). Sin embargo, al emplear otras líneas celulares como la línea de células adiposas del ser humano, las células HepG2 (ligadas a las funciones hepáticas del ser humano), los receptores de estrógeno humano alfa y beta, receptores de andrógenos... sí aparecen trabajos en los que el BP-A tampoco resultó ser citotóxico, al igual que el BP-S (Héliès-Toussaint, Peyre, Costanzo, Chagnon y Rahmani, 2014; Molina-Molina, Amaya, Grimaldi, Sáenz, Real, Fernández, Balaguer y Olea, 2013).

Con respecto al BP-S y contrariamente a lo ocurrido en el anterior estudio mencionado, en el presente estudio si se observa un aumento de la actividad celular, produciéndose el efecto de hormesis, que es un fenómeno de respuesta a dosis, caracterizado por una estimulación en dosis bajas y una inhibición para dosis altas.

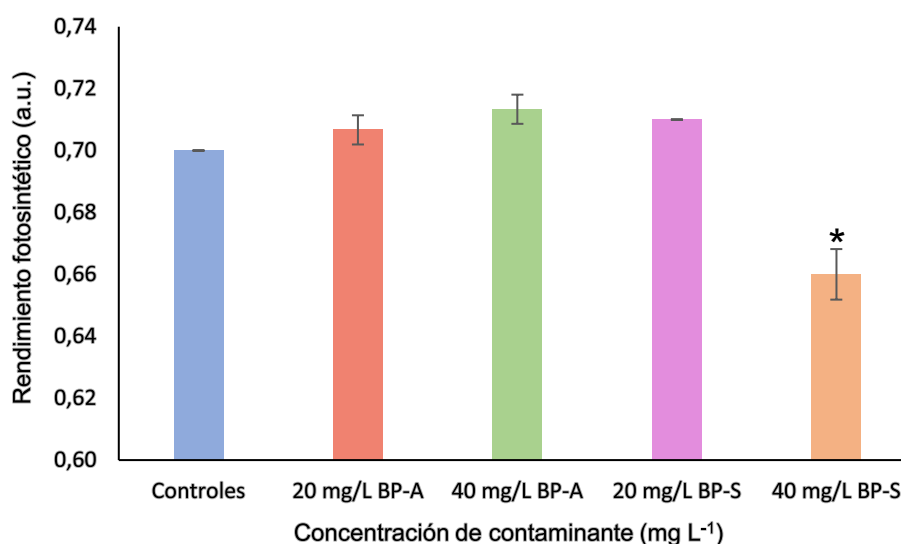
La actividad celular de *C. reinhardtii* no solo se ve afectada por contaminantes plásticos como el BP-A y el BP-S, sino que también se puede ver afectada por otros compuestos como la oxitetraciclina, la cual reduce la viabilidad de las células tras 24 h (Conde, 2016).

Una gran parte de los trabajos que están relacionados con analizar la actividad celular no solo emplean distintas concentraciones de contaminante como es el caso de este estudio, sino que también utilizan variables ambientales como puede ser la temperatura, fotoperiodos, cantidad de nutrientes...(Pardo, 2015).

### 4.3. Fluorimetría de modulación de amplitud de pulso

En este trabajo se empleó la fluorimetría de modulación de amplitud de pulso (PAM) para detectar los efectos fotoinhibidores y contaminantes de las algas, ya que es un método rápido y sensible. El estudio de los resultados permitió conocer la sensibilidad relativa de *C. reinhardtii* a los contaminantes BP-A y BP-S (Juneau, El Berdey y Popovic, 2002).

Los resultados obtenidos en el estudio determinaron que solo hubo diferencias significativas a las 72 h ( $p$ -valor  $< 0,05$ ), por lo tanto, ni a las 24 h ni a las 96 h se apreciaron diferencias entre el tratamiento control y los tratamientos expuestos a las diferentes concentraciones de BP-A y BP-S. Estas diferencias significativas a las 72 h, se produjeron exclusivamente para la máxima concentración de BP-S ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Figura 5).



**Figura 5.** Rendimiento fotosintético en a.u. en los cultivos de *C. reinhardtii* expuestos a diferentes concentraciones de BP- A, BP-S y a un control sin tratamiento tras 72 h. Los valores representan la media de las tres réplicas y su correspondiente desviación estándar. Los asteriscos representan aquellos valores significativos con respecto al control ( $p$ -valor  $< 0,05$ ).

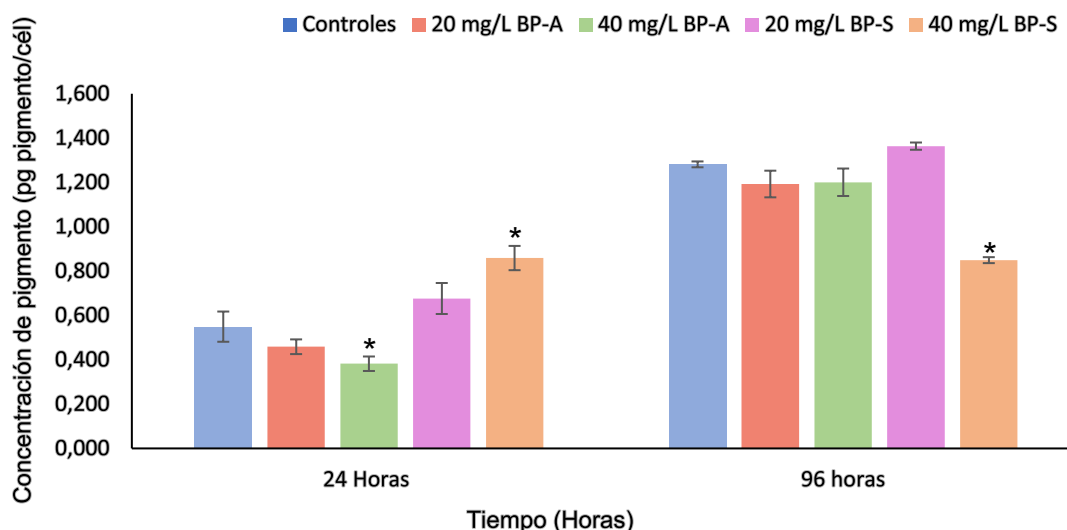
Sin embargo, los valores obtenidos a las 24 h y a las 96 h son similares tanto para el tratamiento control como para los tratamientos en los que las células han estado expuestas a los contaminantes esto podría indicarnos que en el caso de nuestro estudio las células de *C. reinhardtii* no presentan una especial sensibilidad frente al BP-A y al BP-S.

Estudios anteriores demuestran que *C. reinhardtii* puede presentar mayor sensibilidad ante otros compuestos, como por ejemplo el cobre, para el cual tras la exposición de las células 5 h y ante una concentración de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  se produce una respuesta en la fluorescencia, la cual indica que hay una inhibición en el transporte de electrones al PSII (Juneau, El Berdey y Popovic, 2002).

#### 4.4. Determinación de pigmentos fotosintéticos

Los biomarcadores, se emplean con asiduidad en estudios toxicológicos, para detectar la posible presencia de contaminación en los sistemas acuáticos (Banni, Jebali, Daubeze, Clerandau, Guerbej, Narbonne y Boussetta, 2005). Los pigmentos fotosintéticos son los biomarcadores elegidos para detectar los efectos negativos que pueden aparecer en las microalgas como resultado de su exposición a contaminantes (Couderchet y Vernet, 2003).

La cantidad de clorofilas *a* y *b* se ha identificado como el índice idóneo con el que valorar el efecto de los contaminantes en las tasas fotosintéticas y respiratorias de las microalgas (Xu, Li, Chen y Shao, 2013).

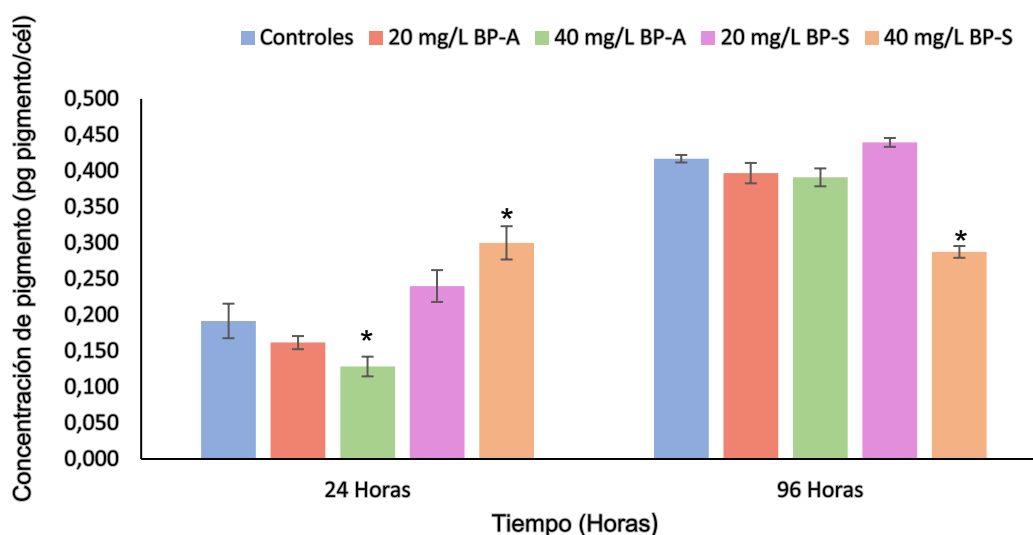


**Figura 6.** Contenido de clorofila *a* expresado en pg pigmento  $\text{cél}^{-1}$  en las células de *C. reinhardtii* expuestas a diferentes concentraciones de BP-A, BP-S y a un control sin tratamiento. Los valores representan la media de las tres réplicas y su correspondiente desviación estándar. Los asteriscos representan aquellos valores significativos con respecto al control ( $p\text{-valor} < 0,05$ ).



Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que tanto para la clorofila *a*, como para la clorofila *b*, así como para los carotenoides, el contaminante BP-S a una concentración de 40 mg L<sup>-1</sup>, afectaba significativamente (p-valor < 0,05) al contenido celular de pigmentos en las células de *C. reinhardtii* tanto a las 24 h como a las 96 h de exposición.

La clorofila *a* y los carotenoides presentaron unos resultados similares como se puede observar en la Figura 6 y 7. A las 24 h se observó una disminución significativa (p-valor < 0,05) en la cantidad de clorofila *a* y de carotenoides para la máxima concentración de BP-A (40 mg L<sup>-1</sup>). Sin embargo, tras 96 h de exposición a esta misma concentración de contaminante, las células se recuperaron y el contenido en clorofila *a* y carotenoides para el tratamiento control y el tratamiento BP-A 40 mg L<sup>-1</sup> fue similar.



**Figura 7.** Contenido de carotenoides expresado en pg pigmento cél<sup>-1</sup> en las células de *C. reinhardtii* expuestas a diferentes concentraciones de BP-A, BP-S y a un control sin tratamiento. Los valores representan la media de las tres réplicas y su correspondiente desviación estándar. Los asteriscos representan aquellos valores significativos con respecto al control (p-valor < 0,05).

En cambio, para el BP-S ocurrió todo lo contrario, a las 24 h se observó un efecto significativo (p-valor < 0,05) para la máxima concentración de contaminante, pero este efecto no fue inhibitorio, sino que para esta concentración de contaminante se obtuvo más cantidad de pigmentos que en el tratamiento control. A las 96 h en los tratamientos expuestos a la máxima

concentración de BP-S, el contenido en pigmentos se mantuvo similar al dado a las 24 h. Sin embargo, tras 96 h el efecto es inhibitorio ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) dado que la cantidad de pigmento para la concentración  $40 \text{ mg L}^{-1}$  BP-S disminuyó con respecto al tratamiento control.

Contaminante ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Contenido de pigmento ( $\mu\text{g}$ pigmento $\text{cél}^{-1}$ ) a las 24 h	Contenido de pigmento ( $\mu\text{g}$ pigmento $\text{cél}^{-1}$ ) a las 96 h
Control	$0,17 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,01$
$20 \text{ mg L}^{-1}$ BP-S	$0,22 \pm 0,03$	$0,48 \pm 0,02$
$40 \text{ mg L}^{-1}$ BP-S	$0,27 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,00$

**Tabla 3.** Contenido de clorofila *b* en las células de *C. reinhardtii* tras 24 y 96 h de exposición a distintas concentraciones de BP-A y BP-S ensayadas. Los valores representan la media de las tres réplicas y su correspondiente desviación estándar.

El contenido de clorofila *b* en las células de *C. reinhardtii*, solo se vió afectado significativamente ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) para la máxima concentración de BP-S, tanto a las 24 como a las 96 h. El efecto que tiene el BP-S para el contenido en clorofila *b* es similar al de la clorofila *a* y los carotenoides; aumentando el contenido del pigmento con respecto al control a las 24 h y disminuyendo a las 96 h como se puede ver en la Tabla 3.

Existen algunos estudios es los que se describe alguna similitud con el presente trabajo como es el caso del BP-A, para el cual se observó que cuando diferentes especies de microalgas marinas se ven afectadas por un aumento en la concentración de dicho contaminante provoca una disminución significativa del contenido celular de pigmentos (Li, Chen, Tam, Luan, Shin, Cheung y Liu, 2009). El BP-A no solo afecta al contenido celular en pigmentos de las células de *C. reinhardtii*, sino que también afecta a otras algas como puede ser *Tetraselmis suecica* para la cual se describe otro factor negativo como es la temperatura (Lorenzo, 2018).

En cuanto al efecto que produce el BP-S sobre el contenido celular es un poco desconcertante, por lo que lo apropiado sería realizar nuevos experimentos para ver qué resultados se obtendrían y ver a que se podrían deber los resultados obtenidos. El estudio del efecto de este contaminante sobre las microalgas es un poco tedioso porque por el momento no se han

hecho muchos estudios sobre sus posibles efectos en estos organismos acuáticos. Sí bien es cierto que si se está empezando a emplear el BP-S en estudios relacionados con células humanas para determinar si se podría sustituir el BP-A, por el BP-S.

## 5. Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que el contaminante emergente Bisfenol S (BP-S) ejerce un mayor efecto tóxico en las células de *Chlamydomonas reinhardtii* que el Bisfenol A (BP-A); aunque este último en menor medida, también afecta a determinados parámetros celulares. El BP-S presentó diferencias significativas en todos los parámetros analizados (densidad celular, actividad celular y actividad fotosintética por ambas vías), al contrario del BP-A que no presentó diferencias significativas en cuanto al análisis de la actividad fotosintética mediante la vía PAM y en la actividad celular.

La sensibilidad del BP-A y BP-S ante el parámetro de la densidad celular hace que este sea el mejor parámetro para indicar la toxicidad ejercida por ambos contaminantes sobre las células de *C. reinhardtii*.

En un futuro, lo ideal sería realizar nuevos ensayos con concentraciones más altas de BP-A y de BP-S, debido a que en la mayoría de los parámetros estudiados las concentraciones más bajas testadas no mostraron diferencias significativas.

## Conclusión

A vista dos resultados obtidos neste estudio pódese concluir que o contaminante emerxente Bisfenol S (BP-S) exerce un maior efecto tóxico nas células de *Chlamydomonas reinhardtii* que o Bisfenol A (BP-A); aínda que este último en menor medida, tamén afecta a determinados parámetros celulares. O BP-S presentou diferenzas significativas en todos os parámetros analizados (densidade celular, actividade celular e actividade fotosintética por ambas vías), o contrario que o BP-A que non presentou diferenzas significativas nin para o análise da actividade fotosintética mediante a vía PAM, nin para a actividade celular.

A sensibilidade do BP-A e BP-S ante o parámetro da densidade celular fai que este sexa o mellor parámetro para indicar a toxicidade exercida por ambos contaminantes sobre as células de *C. reinhardtii*.

Nun futuro, o ideal sería realizar novos ensaios con concentracións máis altas de BP-A e de BP-S debido a que na maioría dos parámetros estudados as concentración máis baixas testadas non mostraron diferencias significativas.

## Conclusions

In view of the results obtained in this study, it can be concluded that the emerging pollutant Bisphenol S (BP-S) exerts a greater toxic effect on *Chlamydomonas reinhardtii* cells than Bisphenol A (BP-A); although the latter to a lesser extent, also affects certain cellular parameters. The BP-S presented significant differences in all the parameters analyzed (cell density, cell activity and photosynthetic activity by both routes), unlike BP-A, which did not show significant differences in terms of the analysis of photosynthetic activity using the PAM route and in cellular activity.

The sensitivity of the BP-A and BP-S to the cell density parameter makes this the best parameter to indicate the toxicity exerted by both contaminants on *C. reinhardtii* cells.

Ideally, new tests with higher concentrations of BP-A and BP-S should be carried out in the future since in most of the parameters studied the lowest concentrations tested did not show significant differences.

## 6. Bibliografía

Banni, M., Jebali, Banni, M., Jebali, J., Daubeze, M., Clerandau, C., Guerbej, H., Narbonne, J. F., & Boussetta, H. (2005). Monitoring pollution in Tunisian coasts: application of a classification scale based on biochemical markers. *Biomarkers*, 10 (2-3), 105-116.

Barceló, D. y López M. J. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Disponible desde internet en

<http://elaguapotable.com/Contaminación%20y%20calidad%20quím%20del%20agua-los%20contaminantes%20emergentes.pdf>.

Becerril, J. E. B. (2009). Contaminantes emergentes en el agua. *Revista Digital Universitaria*, 10 (8), 1067-6079.

Blaise, C. y Menard, L. (1998). A micro-algal solid-phase test to assess the toxic potential of freshwater sediments. *Water Quality Research Journal*, 33 (1), 133-152.

Conde, K. P. (2016). Efecto del antibiótico oxitetraciclina, un microcontaminante acuático emergente, sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard. Disponible desde internet en: <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/17325>.

Couderchet, M. y Vernet, G. (2003). Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. *Ecotoxicology Environment Safety*, 55 (3), 271-277.

Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V. y Habert, R. (2015). A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and Sterility*, 103 (1), 11-21.

Esperanza, M. LI. (2017). Toxicidad ejercida por contaminantes acuáticos sobre microalgas de agua dulce. Disponible desde internet en: <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/19943>.

Esperanza, M., Seoane, M., Servia, M. J. y Cid, Á. (2020). Effects of Bisphenol A on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* and the clam *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 197, 110609.

La Farre, M., Pérez, S., Kantiani, L., y Barceló, D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 27(11), 991-1007.

Gorman, D. S., & Levine, R. P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 54(6), 1665-1669.

Harris, E. H. (2009). The *Chlamydomonas* sourcebook: introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use. *Academic press*, 1.

Héliès-Toussaint, C., Peyre, L., Costanzo, C., Chagnon, M. C., & Rahmani, R. (2014). Is bisphenol S a safe substitute for bisphenol A in terms of metabolic function? An in vitro study. *Toxicology and applied pharmacology*, 280(2), 224-235.

Herrero, O., Aquilino, M., Sánchez, P. A. y Planelló, R. (2018). The BPA-substitute bisphenol S alters the transcription of genes related to endocrine, stress response and biotransformation pathways in the aquatic midge *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *PLoS ONE*, 13 (2). Disponible desde internet en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193387> .

Ji, M. K., Kabra, A. N., Choi, J., Hwang, J. H., Kim, J. R., Abou-Shanab, R.A.I., Oh, Y. y Jeon, B. H. (2014). Biodegradation of bisphenol A by the freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Chlorella vulgaris*. *Ecological Engineering*, 73, 260-269.

Juan-García, A., Gallego, C. y Font, G. (2015). Toxicidad del Bisfenol A: Revisión. *Revista de toxicología*, 32 (2), 144-160.

Juneau, P., El Berdey, A. y Popovic, R. (2002). PAM Fluorometry in the Determination of the Sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to Copper. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 42 (2), 155-164.

La Farre, M., Pérez, S., Kantiani, L., y Barceló, D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 27(11), 991-1007.

Li, R., Chen, G. Z., Tam, N. F. Y., Luan, T. G., Shin, P. K. S., Cheung, S. G., & Liu, Y. (2009). Toxicity of bisphenol A and its bioaccumulation and removal by a marine microalga *Stephanodiscus hantzschii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2), 321-328.

Lorenzo, M. R. (2018). Efecto del contaminante Bisfenol A, a distintas temperaturas, sobre la microalga marina *Tetraselmis suecica*. Disponible desde internet en:

[https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/21321/LorenzoRodriguez\\_M<sup>AM</sup>elisa\\_TFG\\_2018.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/21321/LorenzoRodriguez_M<sup>AM</sup>elisa_TFG_2018.pdf?sequence=2&isAllowed=y).

Luna, L. M. G. (2007). Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*, 19 (2), 3-20.

Matamoros, V., Uggetti, E., García, J., y Bayona, J. M. (2016). Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: a laboratory scale study. *Journal of hazardous materials*, 301, 197-205.

Michalowicz, J. (2014). Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental toxicology and pharmacology*, 37 (2), 738-758.

Mokra, K., Woźniak, K., Bukowska, B., Sicińska, P., y Michalowicz, J. (2018). Low-concentration exposure to BPA, BPF and BPAF induces oxidative DNA bases lesions in human peripheral blood mononuclear cells. *Chemosphere*, 201, 119-129.

Molina-Molina, J. M., Amaya, E., Grimaldi, M., Sáenz, J. M., Real, M., Fernández, M. F., ... & Olea, N. (2013). In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicology and applied pharmacology*, 272(1), 127-136.

Pardo, M. C. (2015). Efecto tóxico del contaminante acuático bisfenol A sobre la microalga marina *Nannochloropsis gaditana*. Trabajo fin de máster. Máster Interuniversitario en Acuicultura. Universidad de Santiago de Compostela.

Patiño, Y., Díaz, E. y Ordoñez, S. (2014). Microcontaminantes emergentes en aguas: Tipos y sistemas de tratamiento. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 5 (2), 1-120.

Peña, A. y Castillo, A. (2015). Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM). *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18(1), 29-42.



Rasala, B. A. y Mayfield, S. P. (2011). The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform for the production of human protein therapeutics. *Bioengineered Bugs*, 2 (1), 50-54.

Rochaix, J.D. (1995). *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annual Reviews Genetic*, 29 (1), 209-230.

Sauvé, S. y Desrosiers, M. (2014). A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*, 8 (1), 1-7.

Torres, S. M. (2015). Efecto del Bisfenol A, unmicrocontaminante acuático emergente, sobre la microalga marina *Tetraselmis suecica*. Disponible desde internet en: [https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/14841/TorresMarono\\_Sabela\\_TFG\\_2015.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/14841/TorresMarono_Sabela_TFG_2015.pdf?sequence=2&isAllowed=y).

Van Wezel, A. P. y Van Vlaardingen, P. (2004). Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquatic Toxicology*, 66 (4), 427-444.

Vianna, M. T. G., Coutinho, R., de Sá Salomão, A. L., & Gomes, M. M. (2019). II-518-otimização do método de microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de Bisfenol-A e Bisfenol-S em efluentes sanitários. Disponible desde internet en: <http://abes.locaweb.com.br/XP/XP-EasyArtigos/Site/Uploads/Evento45/TrabalhosCompletoPDF/II-518.pdf>.

Viñas, R. y Watson, C. S. (2013). Bisphenol S disrupts estradiol-induced nongenomic signaling in a rat pituitary cell line: effects on cell functions. *Environmental health perspectives*, 121(3), 352-358.

Xu, D., Li, C., Chen, H. & Shao, B. (2013). Cellular response of freshwater green algae to perfluorooctanoic acid toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 88, 103-107.

## 7. Abreviaturas

BP-A: Bisphenol A

BP-S: Bisphenol S

TAP: Tris-acetate-phosphate

FDA: Fluorescein diacetate

## 8. Índice de figuras

Figura 1.....	12
Figura 2.....	13
Figura 3.....	18
Figura 4.....	20
Figura 5.....	22
Figura 6.....	23
Figura 7.....	24

## 9. Índice de tablas

Tabla 1.....	18
Tabla 2.....	20
Tabla 3.....	25