



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Citotoxicidade do antibiótico azitromicina sobre
Chlorella vulgaris e protalos de *Culcita
macrocarpa***

**Citotoxicidad del antibiótico azitromicina sobre
Chlorella vulgaris y protalos de *Culcita
macrocarpa***

**Citotoxicity of the antibiotic azithromycin on
Chlorella vulgaris and *Culcita macrocarpa*
prothals**

Sofía Ríos Varela

Curso: 2020 - 2021. Convocatoria: setembro

*Directora 1: Carmen Rioboo Blanco
Director 2: Manuel Pimentel Pereira*

ÍNDICE

1. RESUMO.....	- 3 -
2. INTRODUCCIÓN	- 5 -
3. OBXECTIVOS	- 7 -
4. MATERIAL E MÉTODOS	- 7 -
4.1. DESCRICIÓN DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	- 7 -
4.2. DESCRICIÓN DE <i>CULCITA MACROCARPA</i>	- 8 -
4.3. DESCRICIÓN DO CONTAMINANTE ENSAIADO.....	- 9 -
4.4. CULTIVO MICROALGAL.....	- 10 -
4.5. CULTIVO DE PROTALOS	- 10 -
4.6. CO-CULTIVO	- 11 -
4.7. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN STOCK DE AZITROMICINA.....	- 11 -
4.8. DESEÑO EXPERIMENTAL.....	- 11 -
4.9. EXPERIENCIA FINAL	- 12 -
4.10. DETERMINACIÓN DA TAXA DE CRECEMENTO DOS CULTIVOS DE <i>C. VULGARIS</i>	- 12 -
4.11. DETERMINACIÓN DO PESO SECO DE <i>C. VULGARIS</i>	- 13 -
4.12. DETERMINACIÓN DO PESO HÚMIDO DE <i>C. MACROCARPA</i>	- 13 -
4.13. DETERMINACIÓN DO CONTIDO EN PIGMENTOS NAS CÉLULAS DE <i>C. VULGARIS</i> E NOS PROTALOS DE <i>C. MACROCARPA</i>	- 13 -
4.14. DETERMINACIÓN DA ACTIVIDADE FOTOSINTÉTICA.....	- 14 -
4.15. ANÁLISE DE DATOS	- 15 -
5. RESULTADOS E DISCUSIÓN.....	- 15 -
5.1. ESTUDO DO EFECTO CITOTÓXICO SOBRE A TAXA DE CRECEMENTO DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	- 15 -
5.2. ESTUDO DO EFECTO CITOTÓXICO SOBRE O PESO SECO CELULAR EN <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	- 16 -
5.3. ESTUDO DO EFECTO CITOTÓXICO SOBRE O PESO HÚMIDO DE <i>CULCITA MACROCARPA</i>	- 17 -
5.4. EFECTO CITOTÓXICO SOBRE OS PIGMENTOS NAS CÉLULAS DE <i>C. VULGARIS</i> E NOS PROTALOS DE <i>C. MACROCARPA</i>	- 17 -
5.4. EFECTO CITOTÓXICO SOBRE A ACTIVIDADE FOTOSINTÉTICA NAS CÉLULAS DE <i>C. VULGARIS</i> E NOS PROTALOS DE <i>C. MACROCARPA</i>	- 20 -
5.5. ANÁLISE CONXUNTA	- 22 -
6. CONCLUSIÓNS	- 23 -
7. BIBLIOGRAFÍA.....	- 24 -

1. RESUMO

Os contaminantes emerxentes supoñen un problema global polo seu incremento nos ecosistemas e polo descoñecemento dos potenciais danos que poden causar nos seus habitantes. Derivados da actividade humana, é especialmente preocupante a súa acumulación como compostos contaminantes nas masas de auga. Entre eles, atópanse os antibióticos, que rexistran altas concentracións nas augas residuais españolas. Concretamente, a azitromicina é o máis abundante e o máis concentrado dos detectados.

Para estudar o potencial efecto tóxico que produce este antibiótico, utilizáronse como organismos modelo *Chlorella vulgaris* (microalga amplamente empregada en estudos de ecotoxicidade) e protalos de *Culcita macrocarpa*, que ata este traballo non foron usados en ensaios deste tipo. Ao estudo dos efectos producidos sobre cada organismo cando se expoñen por separado, súmaselle a interacción dos dous organismos en co-cultivo, reflectindo así as condicións de vida en comunidade nos ecosistemas.

Ensaíáronse concentracións de $0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AZT para os seguintes parámetros: taxas de crecemento e de fotosíntese, peso seco e húmido, e do contido celular en pigmentos. Á fin do ensaio os resultados mostraron unha clara inhibición da fotosíntese en ambos organismos. A microalga ademais rexistra un forte aumento da biomasa seca, namentres que os protalos ven decrecido o peso húmido. En co-cultivo, os parámetros de fotosíntese e peso seco experimentan alteracións moito máis acusadas que cando se estudan nos organismos illados.

Palabras clave: azitromicina, *Chlorella vulgaris*, contaminantes emerxentes, *Culcita macrocarpa*, toxicidade.

Resumen

Los contaminantes emergentes suponen un problema global por su incremento en los ecosistemas y por el desconocimiento de los potenciales daños que pueden causar en sus habitantes. Derivados de la actividad humana, es especialmente preocupante su acumulación como compuestos contaminantes en las masas de agua. Entre ellos, se encuentran los antibióticos, que registran altas concentraciones en las aguas residuales españolas. Concretamente, la azitromicina es el más abundante y el más concentrado de los detectados.

Para estudiar el potencial efecto tóxico que produce este antibiótico, se utilizaron como organismos modelo *Chlorella vulgaris* (microalga ampliamente empleada en estudios de ecotoxicidad) y protalos de *Culcita macrocarpa*, que hasta este trabajo no han sido usados en ensayos de este tipo. Al estudio de los efectos producidos sobre cada organismo cuando se exponen por separado, se le suma la interacción de los dos organismos en co-cultivo, reflejando así las condiciones de vida en comunidad en los ecosistemas.

Se ensayaron concentraciones de 0 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, 0,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ y 1 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ de AZT para los siguientes parámetros: tasas de crecimiento y de fotosíntesis, peso seco y húmedo, y del contenido celular en pigmentos. Al final del ensayo los resultados mostraron una clara inhibición de la fotosíntesis en ambos organismos. La microalga además registra un fuerte aumento de la biomasa seca, mientras que los protalos ven disminuido el peso húmedo. En con el-cultivo, los parámetros de fotosíntesis y peso seco experimentan descensos mucho más acusado que cuando se estudian los organismos aislados.

Palabras clave: azitromicina, *Chlorella vulgaris*, contaminantes emergentes, *Culcita macrocarpa*, toxicidad.

Abstract

Emerging pollutants are a global problem due to their increase in ecosystems and the lack of knowledge of the potential damage they can cause to their inhabitants. Derived from human activity, their accumulation as pollutants in water bodies is of particular concern. Among them are antibiotics, which have high concentrations in Spanish wastewater. Specifically, azithromycin is the most abundant and the most concentrated of those detected.

To study the potential toxic effect produced by this antibiotic, *Chlorella vulgaris* (microalgae widely used in ecotoxicity studies) and *Culcita macrocarpa* prothals, which until this work had not been used in tests of this type. To the study of the effects produced on each organism when exposed separately, we added the interaction of the two organisms in co-culture, thus reflecting the conditions of community life in the ecosystems.

Concentrations of 0 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, 0.5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ and 1 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ of AZT were tested for the following parameters: growth and photosynthesis rates, dry and wet weight, and cell pigment content. At the end of the trial, the results showed a clear inhibition of photosynthesis in both organisms. The microalgae also recorded a strong increase in dry biomass, while the prothals saw a decrease in wet weight. In co-culture, the parameters of photosynthesis and dry weight decrease much more markedly than when the organisms are studied in isolation.

Keywords: azithromycin, *Chlorella vulgaris*, emerging pollutants, *Culcita macrocarpa*, toxicity.

2. INTRODUCCIÓN

O emprego a escala global de novos produtos de orixe antropoxénico está levando á súa acumulación nos ecosistemas como compostos contaminantes, con consecuencias na saúde e na biodiversidade aínda non ben entendidas. Neste contexto, enténdese como contaminante emerxente (CE) calquera sustancia química sintética ou de orixe natural, ou calquera microorganismo que non se regule de maneira habitual no medio e con efectos potencialmente adversos sobre as especies (UNESCO, 2021). Na actualidade, estase a prestar especial atención á monitorización destas substancias cada vez máis frecuentes no medio ambiente (González-Gaya, 2021).

O efecto dos CE é especialmente preocupante no medio acuático onde o problema se detectou por primeira vez (Pham et al., 1997; Rosal et al., 2010; Vogelsang et al., 2006). Estas substancias poden alterar o ciclo da auga, impacto que ademais terá un carácter global pola súa alta capacidade de dispersión (Godoy & Sánchez, 2020; Murray et al., 2010). Concretamente, en Europa grandes masas de auga están contaminadas con complexas mesturas de contaminantes emerxentes derivados da actividade antrópica, desde pesticidas e biocidas, pasando por fármacos e produtos cosméticos (Tousova et al., 2017).

O aumento da poboación e a súa acumulación nas grandes áreas urbanas, concentra a emerxencia dos contaminantes ao redor destas zonas. En estudos na bacía do Río Lambro (Italia), seleccionáronse máis de 80 CE e mediuse a súa concentración, en ríos e augas residuais tratadas e non tratadas, así como augas superficiais e subterráneas. Observouse que case todos os CE aparecían nas augas sen tratar, e que as augas superficiais contaminadas contribuían de maneira notable á contaminación das subterráneas (Castiglioni et al., 2018). Noutro estudo, 125 substancias clasificadas como CE foron atopadas en augas residuais da Unión Europea, das cales estímase que cando menos 15 pasarán a ser parte dos CE das augas superficiais (Tousova et al., 2017) onde poden ter consecuencias negativas (Koumaki et al., 2015). Estes CE son extremadamente variados, abranguendo compostos tales como fármacos, compostos perfluorados, hormonas, produtos de hixiene e coidado persoal, pesticidas e outros produtos químicos industriais (Matamoros et al., 2015; Ramos Alvaríño, 2009). Ademais, a miúdo non unicamente os produtos tal e como se emiten representan un risco para os medios acuáticos; tamén os compostos derivados da súa degradación física ou biolóxica (Koumaki et al., 2015).

En concreto, os fármacos supoñen unha adición constante de CE aos medios acuáticos, xa que o seu emprego na sanidade humana e animal non deixa de medrar (Díaz-Cruz et al., 2003). De feito, a súa entrada principal nas augas prodúcese a través dos residuos de orixe humano e animal nas augas residuais (Čelić et al., 2019; Kim et al., 2007; Roberts & Thomas, 2006) nas que se produce unha mestura de metabolitos e substancias practicamente inalteradas (Moro et al., 2014).

Dentro da contaminación emerxente producida por fármacos, a presenza dos antibióticos nas augas supón un grave problema derivado da posibilidade de que se desenvolvan cepas bacterianas resistentes (Díaz-Cruz et al., 2003). O CE estudado neste traballo é a azitromicina (AZT), un dos antibióticos máis

detectados nas augas residuais en diversas zonas de España. Por exemplo, en estudos sobre as concentracións de antibióticos nas Estacións Depuradoras de Augas Residuais (EDAR) viuse que de 17 augas analizadas só o AZT apareceu no 100% das mostras sendo ademais o que rexistrou concentracións máis altas (Martínez et al., 2020). O AZT pertence ó grupo dos Macrólidos, e é empregado no tratamento de diversas infeccións respiratorias e enfermidades de transmisión sexual (Čelić et al., 2019).

A presenza destes contaminantes nos medio doceacuícolas xera ademais das xa referidas resistencias, potenciais danos na flora, na fauna e nos microorganismos que os habitan. Isto é debido a que poden afectar a organismos non diana cuxas funcións nos medios son moi relevantes (degradación de materia orgánica, fixación de elementos e ciclos de nutrientes, etc.) (Näslund et al., 2008; Vannini et al., 2011). Por outra banda, estes compostos a miúdo son bioacumulativos, ascendendo ó longo das cadeas tróficas e concentrándose nos niveis máis altos, alterándose finalmente o conxunto do ecosistema (Campanella et al., 2001; Seoane et al., 2014).

Visto todo o anterior é preciso desenvolver bioensaios de toxicidade con organismos representativos do medio, e así poder estudar o efecto nocivo dos compostos e establecer as concentracións umbral que producen dito efecto.

Na actualidade, as microalgas son os principais organismos empregados como modelos nas análises de toxicidade ambiental, debido á súa gran sensibilidade a un extenso grupo de sustancias (Fu et al., 2017; Ma et al., 2006) e á rapidez de reacción ante os cambios do medio no que habitan. Son ademais abundosas, tanto en augas doces como salgadas (Ospina Alvarez, 2004). Algunhas das especies máis empregadas serán *Chlorella vulgaris* Beijerinck e *Chlamydomonas reinhardtii* P.A.Dang. As algas verdes (Div. Chlorophyta) son claramente as máis empregadas nestes estudos pola súa abundancia nos medios doceacuícolas e a facilidade de cultivo de moitos dos seus representantes.

Se ben as especies bioindicadoras adoitan ser de fácil cultivo e de ampla distribución (González Zuarth et al., 2014) é importante atopar novas especies con capacidade indicadora en medios de alto valor ambiental. Os feitos verdadeiros (Tracheophyta, Euphyllophytina, Moniliformopses) poden ser bos candidatos a explorar neste contexto. Os feitos son seres duais, presentando gametófitos talofíticos a miúdo de óptimo acuático que son moi reactivos fronte ao medio externo. Neles prodúcese unha fecundación oógama (parcialmente interna) mediada por gametos masculinos flaxelados (Díaz González et al., 2004).

Os feitos representan o 2,8% das especies da flora galega. Porén, debido en parte ó seu ciclo diplobióntico a moitos deles aparecen nas listaxes de especies ameazadas e protexidas (Amigo, 2005). As principais ameazas ás que se atopan sometidos son a transformación do seu hábitat para cultivos agrícolas e forestais, a tala de bosques e a redución do terreo dispoñible polo desenvolvemento urbano (Brummitt et al., 2016). Non obstante, o posible efecto dos contaminantes emerxentes na poboacións de gametófitos non é coñecida. *Culcita macrocarpa* C.Presl. (Culcitaceae) é un feito ameazado (Quintanilla et al., 2007) de baixa diversidade xenética e desenvolvemento lento (Martínez, 2021; Quintanilla et al.,

2007). Os gametófitos de *C. macrocarpa* desenvólvense canda pequenos regos en fragas hiperhúmidas, sendo polo tanto practicamente acuáticos e vense potencialmente atinxidos polos CE das augas continentais (Kessler et al., 2018; Moro et al., 2014).

Os organismos nos ecosistemas nunca viven illados entre si, senón que forman comunidades e interactúan entre eles. A análise *in vitro* da reacción de organismos convivintes ante os contaminantes permitirá apreciar esa interacción no que se refire ós CE. Por elo, analizarase tamén a interacción de *Chlorella vulgaris* Beijerinck xunto con protalos de *Culcita macrocarpa* C. Presl.

3. OBXECTIVOS

O obxectivo principal deste traballo é avaliar o efecto citotóxico do antibiótico azitromicina sobre a microalga *Chlorella vulgaris* e sobre os protalos de *Culcita macrocarpa*. Porén, ademais de estudar o impacto sobre cada especie, avaliarase tamén o potencial efecto da interacción entre os dous organismos no impacto do contaminante emerxente. A análise do efecto antibiótico sobre os organismos en co-cultivo permitirá achegarse máis ás condicións normais nas que se desenvolven nos ecosistemas. Dito estudo da citotoxicidade da azitromicina abordárase a través da análise das taxas de crecemento e de fotosíntese, do peso seco e húmido, e do contido celular en pigmentos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DESCRICIÓN DE *CHLORELLA VULGARIS*

A especie microalgal empregada no presente traballo, *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyta, Chlorophyceae, Chlorellales; Leliaert et al., 2012), obtívose da Colección de Cultivos de Algas e Protozoos (CCAP 211/11B; Culture Collection of Algae and Protozoa) do Instituto de Ecoloxía de Auga Doce (Cumbria, Reino Unido). A directiva europea 87/302/EEC recomenda o uso desta cepa en ensaios de toxicidade de contaminantes.

Chlorella vulgaris (Fig.1) é un alga verde unicelular de auga doce, cuxas células se presentan normalmente illadas, se ben eventualmente poden formar agregados. Teñen forma cocoide, carecen de flaxelos e o seu tamaño oscila entre os 3,75 e 6 μm de diámetro (Bourrelly, 1990). As células de *C.vulgaris* presentan unha parede celular celulósica ríxida, fina e lisa que se compón de esporopolenina, politerpeno moi resistente á degradación (Becker, 1994; Soeder & Hewegald, 1998).

Cada célula posúe un cloroplasto parietal único en forma de copa, con abertura irregular e cun pirenoide, que ocupa gran parte do volume celular (Sant'Anna, 1984). Os pigmentos presentes nas células de *C.vulgaris* son clorofila *a* e *b*, β -carotenos e varias xantofilas. Como material de reserva almacenan amidón asociado ao pirenoide interior do cloroplasto. Reprodúcense asexualmente

mediante a formación de autosporas que se liberan ao medio cando a parede da célula nai rompe (Van de Hoek et al., 1995).

As especies do xénero *Chlorella* teñen marcadas diferenzas no seu comportamento ante factores coma a salinidade, acidez e temperaturas, aínda que de forma xeral toleran amplos rangos de variación neses parámetros (Kessler, 1986). A maioría das especies do xénero son doadamente cultivables, polo que, frecuentemente son empregadas como modelo biolóxico en investigacións fisiolóxicas e bioquímicas (Van den Hoek et al., 1995).

Chlorella vulgaris medra rapidamente a temperaturas relativamente elevadas e tolerando ata 37°C, en condicións de cultivo a ceo aberto. No medio natural *C.vulgaris* ten unha distribución cosmopolita e é frecuente en numerosos medios doceacuícolas, incluíndo medios extremos como as augas residuais, as lagoas de oxidación, o solo e a atmosfera. Algúns cocoides de auga doce do xénero *Chlorella* poden aparecer como endosimbiontes en animais invertebrados (Van den Hoek et al. 1995).

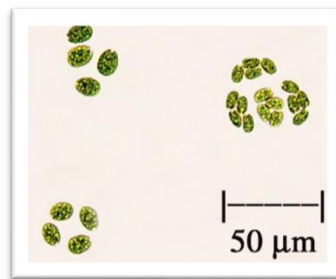


Figura 1. Imaxe ao microscopio de células de *Chlorella vulgaris*

<https://eol.org/pages/47344656> (20/07/21)

4.2. DESCRIPCIÓN DE *CULCITA MACROCARPA*

Culcita macrocarpa C Presl. (Polypodiopsida, Cyatheaales, Dicksoniaceae) é un feito isospóreo con esporófitos de gran tamaño e de porte rastreiro-arborescente (Fig.2). Presenta un rizoma bastante grosso e cuberto de páleas pluricelulares filiformes do que saen frondes que poden chegar a medir ata 3 m de limbo escuro e triangular. As frondes producen no inverno numerosas esporas recalcitrantes, sensibles aos cambios na humidade do medio (Ballesteros et al.2012; Castroviejo et al. 1986; Delgado & Plaza, 2006).

Como todos os feitos moniliófitos, *C. macrocarpa* presenta ciclos dixenéticos diplobiontes nos que as esporas producen gametófitos talófitos de vida libre que serán os que expresen a sexualidade do ciclo. Os gametófitos de *C. macrocarpa* (protalos haploides; Fig. 4) son de crecemento lento e carecen de estruturas de sostén ou de protección fronte á desecación, o que limita moito o desenvolvemento das poboacións da especie (Fernández Martínez, 2020; Quintanilla et al., 2000). Estas limitacións reflíctense na distribución da especie, limitada a zonas hiperhúmidas da Macaronesia e do N e W da Península Ibérica (Atlántico-Macaronésico); (Kessler et al., 2018; Quintanilla et al., 2000).

Durante o desenvolvemento do gametófito aparecen primeiro os anteridios (que son os gametanxios masculinos) e posteriormente os arquegonios establecéndose un ciclo reprodutivo no que a autogamia se ve moi favorecida existindo moi pouca variabilidade xenética nas poboacións (Quintanilla et al., 2005; Verma, 2001).

A nivel nacional, *C. macrocarpa* aparece incluída na *Lista Roja de la Flora Vasculare Española* (Bañares et al., 2010) como en perigo, así como no Catálogo Galego de Especies Ameazadas con idéntica categoría (Decreto 88/2007 do Goberno de Galicia). Ademais, a UICN (*International Union for Conservation of Nature*) considéraa como especie case ameazada (*near threatened*), escasa en toda a súa área de distribución agás nas Illas Azores (Bañares et al., 2004).



Figura 2. Fronde de *C. macrocarpa*



Figura 3. Soros de *C. macrocarpa* protexidos polo indusio

<https://biodiversidade.eu/especie/culcita-macrocarpa-c-presl/?lang=es> (22/07/21)

4.3. DESCRICIÓN DO CONTAMINANTE ENSAIADO

A capacidade antibiótica da azitromicina (AZT) foi descuberta a finais da década dos setenta do século XX en Zagreb por unha empresa farmacéutica croata, Pliva. No 1981, este composto foi patentado mundialmente (Banić Tomišić, 2021). Este antibiótico pertence, xunto á claritromicina e eritromicina ó grupo dos macrólidos, compostos bacteriostáticos que só a concentracións elevadas presentan actividade bactericida.

A AZT (Fig. 4) é un derivado da eritromicina (Fig. 4), da que difire pola inserción dun átomo de nitróxeno asociado a un grupo metil na posición 9 do anel lactónico. Ten unha baixa solubilidade en auga e a súa fórmula molecular é: $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ (peso molecular: 749,00 g mol⁻¹). O seu mecanismo de acción baséase na unión de maneira reversible á subunidade ribosómica 50S dos procariotas, bloqueando a translocación de aminoácidos (Turic, 2010).

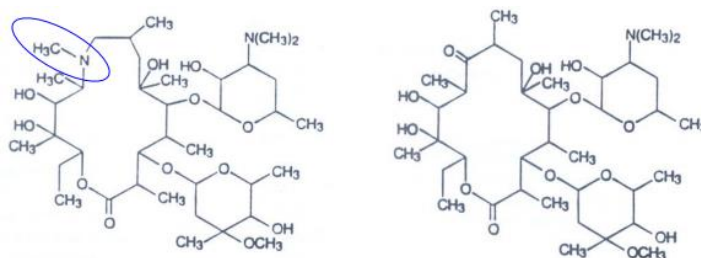


Figura 4. Estrutura química da azitromicina (esquerda) e eritromicina (dereita).

http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/61118/Documento_completo.pdf-PDFA1b.pdf?sequence=1&isAllowed=y (21/07/21)

Malia ser un macrólido (pouca actividade ante as bacterias Gram negativas), a presenza do grupo metilo na posición 9 do anel confírelle unha maior carga positiva que amplía o espectro antibacteriano con respecto á eritromicina (Turic, 2010). Porén, segue a ser inactiva con algunhas especies coma *E.coli* e outras dentro dos xéneros *Salmonella*, *Shigella* e *Pseudomonas* (Zuckerman, 2000).

Malia a súa eficacia bactericida parcial, o uso da AZT en medicina está xustificado pola potencialidade de acadar os tecidos con moita máis rapidez ca outros antibióticos, e polo tanto por unha posible redución da dose a administrar (Zuckerman, 2000). É precisamente pola súa eficiencia polo que está aumentando o seu consumo e polo que aparece como CE nas augas (Peña-Guzmán et al., 2019). Concretamente en estudos nas EDAR de España apareceu nunha concentración de ata $1,11 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en efluentes (Martínez et al., 2020). Esta alta frecuencia é a razón pola que se escolle para este traballo.

4.4. CULTIVO MICROALGAL

Os cultivos de *Chlorella vulgaris* realízanse no medio GOLDMEDIUM-FWS (*fresh water species*) comercial (Aqualgae, Santiago de Compostela). O cultivo de mantemento faise en botellas Pyrex de 0,5 L, que logo se trasladará convenientemente diluído a tubos Afora (60 mL), os cales se manteñen nunha cámara durante todo o experimento con aireación mediante a insuflación de aire atmosférico a $10 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ cun turbosoplador. O aire entrante filtrouse previamente a través dun filtro de $0,22 \mu\text{m}$ de diámetro de poro. No que se refire á intensidade de luz, os cultivos irrádianse a $100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nun ciclo de 12h de luz e 12h de escuridade. A temperatura mantense constante a 18°C . Todos os medios e materiais que se empregan para o cultivo das microalgas esterilízanse en autoclave (RAYPA) a 120°C durante 20 minutos.

4.5. CULTIVO DE PROTALOS

As esporas empregadas cultiváronse en placas de Petri embebidas co medio mineral de Dyer (1983) ó 1% de agar suplementado co antifúngico nistatina (10 U/mL) disolto en dimetilsulfóxido (Dyer, 1983; Quintanilla et al., 2002). Antes da sembra, ás esporas engádeselles nun tubo eppendorf deterxente PVP (polivinilpirrolidona), evitando así a súa hidrofobia. O contido dos tubos trasládase por envorcado ás placas Petri axudando á súa distribución con esferas de vidro estériles. A continuación, seguíronse as mesmas condicións de cultivo que a microalga, excepto a aireación. Cando se obteñen os protalos dun tamaño aceptable, pásanse a tubos Afora con medio GOLDMEDIUM-FWS agora xa con aireación, que volven seguir as mesmas condicións cas microalgas.

4.6. CO-CULTIVO

A co-cultivo das microalgas *Chlorella vulgaris* con protalos de *Calocitca macrocarpa*, realizouse tamén no GOLDMEDIUM-FWS seguindo as mesmas condicións de cultivo descritas nos apartados previos.

4.7. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN STOCK DE AZITROMICINA

Partimos dunha concentración de 1 mg.L^{-1} de AZT nunha solución *stock* de $200 \mu\text{L}$ de metanol. O emprego do AZT debe asociarse cun solvente (o metanol neste estudo) xa que o AZT presenta baixa solubilidade na auga. As cantidades de AZT foron calculadas para as concentracións de cada réplica, referenciadas aos resultados dos estudos sobre augas tratadas e non tratadas de España (Čelić et al., 2019; Martínez et al., 2020), e son as seguintes; un control con $0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.8. DESEÑO EXPERIMENTAL

Co obxectivo de avaliar a citotoxicidade do antibiótico azitromicina sobre os cultivo de microalgas e os protalos, individualmente e en co-cultivo realizouse un bioensaio a 5 e 10 días vista.

Primeiro de todo comentar que as condicións de todos os ensaios son as mesmas en canto a condicións de aireación, temperatura e fotoperiodo que son os descritos previamente; tanto para os experimentos previos de estandarización, como para o cultivo das esporas, así como dos stocks e das réplicas do experimento definitivo.

Para optimizar os cultivos desta experiencia definitiva, fixéronse tres previas:

1. Cultivo de esporas: probouse a cultivar protalos e algas en medio Dyer (1983) pero que deu peores resultados có medio Gold. O cultivo das esporas fíxose partindo de tubos de esporas de *Calocitca macrocarpa* (recollidas 01/2021, poboación Fragas do Eume; recolectadas con permiso da Xunta de Galicia). Porén, malia levarse a cabo o proceso de sementado decidiuse empregar protalos máis vellos xa desenvolvidos, aínda que estériles, (sementados o 25/09/2020) pola lentitude observada no desenvolvemento.
2. Comprobación do crecemento dun cultivo *stock* de microalga, para estandarizar a densidade celular aproximada inicial de *Chlorella vulgaris* cos mesmos intervalos de tempo que na experiencia definitiva.
3. Cultivo de microalgas, protalos e co-cultivo para observar a viabilidade dos organismos no medio seleccionado, así como destacar unha potencial estimulación ou inhibición do crecemento entre ámbolos dous.

Logo destas experiencias previas e con todo estandarizado procedeuse á realización da experiencia definitiva.

4.9. EXPERIENCIA FINAL

En primeiro lugar, estrutúranse tres tipos de cultivo: un con células de *C. vulgaris*, outro con cultivo de protalos de *C. macrocarpa* e outro que mestura protalos de *Chlorella* con células de *Chlorella*.

En primeiro lugar, prepáranse cultivos tanto de *C. vulgaris*, a unha densidade celular inicial de 100.000 células/mL, como de *C. macrocarpa*, cun total de 20 unidades de protalos por réplica. Do mesmo modo, prepáranse os co-cultivos con ambas especies. As réplicas dispóñense en tubos Afora, cun volume total de 60 mL de cultivo en medio GOLDMEDIUM-FWS por réplica, aos que se lles engade a cantidade de AZT e metanol correspondente (Fig. 5)

En tanto ás concentracións ensaiadas de AZT, estas foron 0,5 µg.ml⁻¹, 1 µg.ml⁻¹ empregándose sempre un control se mesma cantidade de metanol que os cultivos con AZT, de cada tipo de cultivo e con dúas réplicas por concentración.

A análise dos parámetros estudados: (taxas de crecemento e de fotosíntese, do peso seco e húmido, e do contido celular en pigmentos) levarase como está indicado con anterioridade tras 5 días e 10 días de exposición ao antibiótico.



Figura 5. cultivos empregados nos ensaios de toxicidade fronte ao AZT.

4.10. DETERMINACIÓN DA TAXA DE CRECIMENTO DOS CULTIVOS DE *C. VULGARIS*

A taxa de crecemento estudouse para os cultivos microalgais. A densidade celular dos cultivos de *Chlorella* e co-cultivo estímase mediante o reconto en cámara de *Neubauer* do número de células microalgais. Realízase a toma de alícuotas de cada cultivo o día 5 e o día 10, e o reconto faise coa axuda dun microscopio óptico de fases Nikon Eclipse E400.

No caso de obter densidades celulares que superasen ás 200 células por cuadrante, realizáronse as consecuentes dilucións. Tras o reconto, o cálculo das taxas de crecemento para cada tempo e concentración de azitromicina ensaiada, expresada en día⁻¹ faise mediante a seguinte fórmula:

$$T.C.= [\log(N_t)- \log (N_0)]/\log 2 (t-t_0)$$

En dita fórmula (t_0) e (t) son o tempo inicial e final do período estudado ambos expresados en días, e (N_t) e (N_0) o número de células. ml^{-1} neses tempos.

4.11. DETERMINACIÓN DO PESO SECO DE *C. VULGARIS*

Tras determinar a densidade celular de cada cultivo de *Chlorella* e co-cultivo, filtranse volumes coñecidos de cultivo en filtros de microfibra de vidro, previamente tarados e secados en estufa a 55°C. Os filtros colócanse nun sistema de filtrado Multifilter, e unha vez acabado o filtrado retíranse coidadosamente con pinzas, e lévanse en placas de Petri á mesma estufa, onde estarán polo menos 48h ata o seu peso constante (que se calcula pola diferenza da tara do primeiro día).

4.12. DETERMINACIÓN DO PESO HÚMIDO DE *C. MACROCARPA*

No caso dos cultivos con protalos, estes foron recollidos e pesados ao principio e ao final da experiencia, sen empregar métodos de secado adicionais, polo tanto obtivemos o peso húmido dos mesmos.

4.13. DETERMINACIÓN DO CONTIDO EN PIGMENTOS NAS CÉLULAS DE *C. VULGARIS* E NOS PROTALOS DE *C. MACROCARPA*

Para a análise espectrofotométrica dos pigmentos de *C. vulgaris*, recóllese un número coñecido de células por centrifugación dun volume determinado de cultivo nunha centrífuga con refrixeración (5°C) durante 10 minutos. Ao rematar este ciclo de centrifugado, descártase o sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur, e o precipitado resuspéndese en metanol 100%.

Para favorecer a extracción dos pigmentos que quedan no pellet, as mostras lévanse á neveira en escuridade durante 48h tras un ciclo de ultrasóns de 20s en auga xeadada. Logo levarase outra vez á centrífuga (mesmas condicións de centrifugado) para proceder á análise. Recóllese o sobrenadante que contén os pigmentos extraídos das células e realízanse as lecturas das absorbancias, ás lonxitudes de onda de :665,2, 652,5 e 470 nm. O aparello empregado para as lecturas é o espectrofotómetro UV-PharmaSpec 1700 Shimaduzu.

No caso dos cultivos de protalos, extráese un de cada réplica, sécase cun papel de filtro, e unha vez pesado, introdúcese nun tubo eppendorf cun volume coñecido de metanol 100%. A continuación, o protalo homoxenízase no propio tubo coa axuda dun émbolo. Posteriormente lévase a cabo a incubación en neveira e a centrifugación. Finalmente realízase a medida no espectrofotómetro anteriormente citado coas mesmas lonxitudes de onda.

As lonxitudes de onda e os coeficientes aos cales se produce a máxima absorción varían dependendo do solvente, polo que empregamos metanol e

seguimos os recollidos por Litchenthaler (1987). Partindo disto, as ecuacións para o cálculo dos pigmentos son:

- Clorofila $a = 16,72 A_{665,2} - 9,16 A_{652,4}$
- Clorofila $b = 34,09 A_{652,4} - 15,28 A_{665,2}$
- Carotenoides = $(1000 A_{470} - 1,63 \text{ cl } a - 104,96 \text{ cl } b) / 221$

onde as clorofilas a , b , e carotenoides representan concentracións en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de extracto e as $A_{665,2}$, $A_{652,4}$ e A_{470} son absorbancias ($\text{DO} = \log I_0/I$) ás lonxitudes de onde 665,2, 652,4 e 470 nanómetros, respectivamente.

4.14. DETERMINACIÓN DA ACTIVIDADE FOTOSINTÉTICA

Neste caso, a análise realízase maneira diferente para os protalos e a *Chlorella*.

Para os cultivos de microalga, o rendemento fotosintético analizouse por fluorimetría mediante modulación de amplitude de pulso (PAM, *Pulse Amplitude Modulation*) empregando o fluorímetro AquaPen-C-AP-C100 (Photon Systems Instruments, Drasov, República Checa), que refire medidas de eficiencia do fotosistemas II (PSII).

Este dispositivo está preparado para medir a fluorescencia dos pigmentos de microalgas e cianobacterias, conta cun lector de cubetas, unha fonte de emisión de luz LED azul (455 nm) para a excitación da clorofila da microalga e unha fonte de emisión de luz vermella (620 nm).

Para o procedemento, en primeiro lugar tómanse alicuotas dos cultivos, que se deixan en escuridade durante 30 minutos. As alicuotas introdúcense nas cubetas e son iluminadas, polo que os fotosistemas captan a luz mediante os complexos antena. Ao funcionaren a máxima capacidade, a luz que non son capaces de empregar pero si absorber, reflíctena e é medida polo dispositivo. Esa fluorescencia non empregada denomínase *Quantum Yield* (QY). A maiores valores de QY, menores fluorescencias emitidas en condicións de saturación de luz, e polo tanto en mellor estado se atopará o fotosistema. As células que se atopan en condicións óptimas referenciarán valores de QY elevados.

Para os protalos empregamos outro método e outro aparello, se ben a base da metodoloxía empregada é a mesma. Utilizouse un fluorímetro JUNIOR-PAM (Walz, Efeltrich, Alemaña). Para elo, mantéñense os protalos en escuridade ó longo de 30 minutos. A continuación aplícaselles unha luz de fondo cun pico de emisión de 650 nm, obtendo nese momento o valor de F_o (nivel de fluorescencia mínimo en organismos adaptados á escuridade). Posteriormente, aplícase un pulso de saturación de 665 nm (luz actínica) co que se obtén o valor de F_m (nivel de fluorescencia máximo en organismos adaptados á escuridade). A continuación, aplícase un novo pulso de saturación co que se obtén o valor de F'_m ou nivel de fluorescencia máximo en organismos preiluminados. Por último, a aplicación dunha luz vermello-afastado (730 nm) conxuntamente coa eliminación da luz actínica proporcionanos o valor de F'_o ou nivel de fluorescencia mínimo en organismos preiluminados. Todos estes valores, permiten calcular parámetros como o rendemento cuántico (QY), a taxa de transferencia de electróns, etc.

4.15. ANÁLISE DE DATOS

Realízanse análises estatísticas exploratorias para os resultados obtidos de taxa de crecemento, peso seco, peso húmido, contido en pigmentos e fotosíntese, calculando medias e desviacións estándar das réplicas do tratamento con AZT así como dos controis, co programa MS- Excel 2016.

Asemade, os datos obtidos analízanse estatisticamente mediante o estudo da varianza (ANOVA) dun só factor (cun nivel de confianza do 95%, significación de α de 0,05) co software IBM SPSS Statistics (versión 28.0.0.0). Valóranse dúas hipóteses: a primeira que a exposición dos cultivos ante os AZT non afecta aos parámetros estudados; e a segunda se a interacción entre a microalga e os protalos non afecta aos mesmos parámetros.

Se o contraste ANOVA resulta significativo, aplicaremos unha proba Post-hoc do Test de Tukey, que compara por parellas as variables seleccionadas. As gráficas realizáronse co MS-Excel 2016.

5. RESULTADOS E DISCUSIÓN

5.1. ESTUDO DO EFECTO CITOTÓXICO SOBRE A TAXA DE CRECEMENTO DE *CHLORELLA VULGARIS*

Os resultados obtidos no presente traballo respecto ás taxas de crecemento indican claramente que a exposición ó antibiótico afecta significativamente inhibindo o desenvolvemento da microalga (Táboa 1). No cultivo puro de *Chlorella*, a diminución tras dez días de ensaio é do 3,8% sobre a mostra control. No caso do co-cultivo o descenso é moito máis acusado, alcanzando o 35%.

Porén, non existen diferenzas significativas ata o día dez no efecto da azitromicina sobre a taxa de crecemento de *Chlorella* cando esta se cultiva sola fronte aos danos que se producen cando esta se cultiva en conxunto cos protalos.

Táboa 1. Resultados en día⁻¹ das taxas de crecemento de *Chlorella vulgaris* (sola e en co-cultivo cos protalos) respecto ás concentracións ensaiadas de azitromicina. Cv_ fai referencia aos cultivos puros de *Chlorella* e CvCm_ aos co-cultivos cos protalos.

Azitromicina (mg. L ⁻¹)	día 5	día 10
Cv_0	0,85 ± 0,03 ^a	0,78 ± 0,01 ^a
Cv_0,5	0,85 ± 0,02 ^a	0,78 ± 0,01 ^a
Cv_1	0,81 ± 0,00 ^b	0,75 ± 0,01 ^b
CvCm_0	0,74 ± 0,03 ^a	0,80 ± 0,01 ^a
CvCm_0,5	0,74 ± 0,01 ^a	0,68 ± 0,03 ^b
CvCm_1	0,66 ± 0,02 ^b	0,52 ± 0,03 ^c

Numerosos estudos sinalan a azitromicina e outros macrólidos como uns dos fármacos máis tóxicos para o crecemento microalgal. Algúns como a

claritromicina presentan danos moi significativos mesmo con concentracións menores de 1 mg.L⁻¹ (Aubakirova, 2017). No que se refire á azitromicina, os nosos resultados son coherentes co observados en estudos previos (Aubakirova, 2017). Outros artigos sinalan que a toxicidade dos macrólidos en *Chlorella vulgaris* vai en progresivo ascenso a medida que aumentan os días de exposición (Aderemi et al., 2021).

A coñecemento dos autores, non se ten probado o efecto do antibiótico en *C. vulgaris* en co-cultivo con outros organismos. Os resultados obtidos resultan chamativos porque apuntan a unha interacción negativa entre as dúas especies que afecta en gran medida ó crecemento da alga.

5.2. ESTUDO DO EFECTO CITOTÓXICO SOBRE O PESO SECO CELULAR EN *CHLORELLA VULGARIS*

Ao igual que a taxa de crecemento celular, o cálculo do peso seco é un parámetro básico en ensaios de toxicidade (Van Wezel & Van Vlaardingen, 2004). O seu análise conxunto amosa resultados dispares pero coherentes coa afectación polo antibiótico. Máis concretamente, os efectos da azitromicina son altamente notables en tanto á medición do peso seco tras dez días (Táboa 2).

No cultivo puro de *C. vulgaris* apréciase un forte aumento do peso seco de case o 24% no día 5, chegando a ser do 52,46% no día 10.

No caso do co-cultivo, o aumento da biomasa seca é moito maior en ambos os dous días, cun incremento de case o 515% no décimo día. Porén estes datos contan con desviacións moi altas o que pode interferir na fiabilidade dos datos.

Aquí tamén existen diferenzas significativas ($p < 0,05$) respecto á toxicidade da azitromicina sobre a microalga, respecto a cando se atopa en co-cultivo, é dicir de novo vólvelle afectar negativamente a interacción cos protalos.

Táboa 2. Resultados en pg.cél⁻¹ dos pesos de *Chlorella vulgaris* (sola e en co-cultivo cos protalos) respecto ás concentracións ensaiadas de azitromicina. Cv_ fai referencia aos cultivos puros de *Chlorella* e CvCm_ aos co-cultivos cos protalos.

Azitromicina (mg. L ⁻¹)	día 5	día 10
Cv_0	64,61 ± 3,47 ^a	11,19 ± 0,40 ^a
Cv_0,5	58,39 ± 3,42 ^a	7,47 ± 03,61 ^a
Cv_1	80,06 ± 6,08 ^b	17,06 ± 03,29 ^b
CvCm_0	50,72 ± 46,12 ^a	9,05 ± 0,53 ^a
CvCm_0,5	33,42 ± 7,98 ^a	11,43 ± 01,85 ^a
CvCm_1	108,92 ± 20,98 ^b	55,58 ± 22,62 ^b

A maioría dos estudos conclúen que ante a exposición a concentracións crecentes de antibióticos sobre algas adoitan producirse descensos na biomasa seca a medida que aumentan as concentracións de contaminante (Seoane et al., 2014). Porén, o descenso na taxa de crecemento unida ó aumento do peso seco tras a exposición pode deberse a que primeiro induza un aumento no tamaño

das células con respecto ás do control, aínda que logo a presenza do antibiótico provoque un bloqueo na división celular. Desta maneira as células de *Chlorella* experimentan ao principio un incremento, pero a medida que se alonga a exposición ó macrólido as células non chegan a completar a división celular.

5.3. ESTUDO DO EFECTO CITOTÓXICO SOBRE O PESO HÚMIDO DE *CULCITA MACROCARPA*

O parámetro de peso húmido en caso dos protalos de *C. macrocarpa*, reflicte a situación contraria que en *Chlorella*; aquí o descenso do tamaño observado non é significativo ($p > 0,05$), e non se pode atribuír un descenso medio do case 8% á exposición ao antibiótico (Táboa 3). Este descenso xeral podería producirse polas condicións xerais do cultivo, en tanto as necesidades lumínicas de algas e protalos non parecen ser as mesmas, xa que os protalos acadan óptimos desenvolvementos a baixas luminosidades (Quintanilla et al., 2000).

Pero este descenso xeral non é coherente co observado noutros apartados, o que suxire problemas nas medidas probablemente derivados do secado das mostras, xa que este non se fixo de maneira completa tratando así de non danar os protalos; aplicouse logo un secado máis exhaustivo na segunda medición do día 10.

No caso do co-cultivo ven incrementados o seu peso en máis dun 25% aos dez días, aínda que este dato non ofrece significación, tampouco a ofrece a interacción coa microalga en co-cultivo onde non existen diferencias significativas entre a afectación co cultivo puro e do co-cultivo nin no día 5 nin no día 10.

Táboa 3. Resultados en mg. protalo^{-1} do peso húmido dos protalos de *C. macrocarpa* (sos e en co-cultivo coa microalga) respecto ás concentracións ensaiadas de azitromicina. Cm_ fai referencia aos cultivos puros de *Culcita macrocarpa* e CmCv_ aos co-cultivos coa microalga.

Azitromicina (mg. L^{-1})	día 5	día 10
Cm_0	122,10 \pm 3,39 ^a	80,15 \pm 39,10 ^a
Cm_0,5	109,05 \pm 12,52 ^a	73,95 \pm 23,12 ^a
Cm_1	111,20 \pm 2,55 ^a	75,05 \pm 15,34 ^a
CvCm_0	103,20 \pm 3,96 ^a	77,65 \pm 10,25 ^a
CvCm_0,5	128,80 \pm 0,28 ^a	97,35 \pm 5,59 ^a
CvCm_1	115,10 \pm 8,63 ^a	97,10 \pm 2,40 ^a

5.4. EFECTO CITOTÓXICO SOBRE OS PIGMENTOS NAS CÉLULAS DE *C. VULGARIS* E NOS PROTALOS DE *C. MACROCARPA*

O contido celular en pigmentos é usado como biomarcador en ensaios de toxicidade con microalgas (Couderchet & Vernet, 2003), sendo o máis empregado a clorofila *a*. No presente traballo analizáronse ademais a clorofila *b* e os carotenoides.

Nos ensaios con *Chlorella*, hai diferenzas importantes entre os días cinco e dez de cultivo. Como se amosa na Figura 6, só a clorofila a rexistra diferenzas significativas ante a exposición á azitromicina (cun descenso do 12%) no quinto día de cultivo. Porén ningunha das outras condicións de cultivo reflicte cambios no seu contido de pigmentos tras este tempo para ningún dos pigmentos analizados.

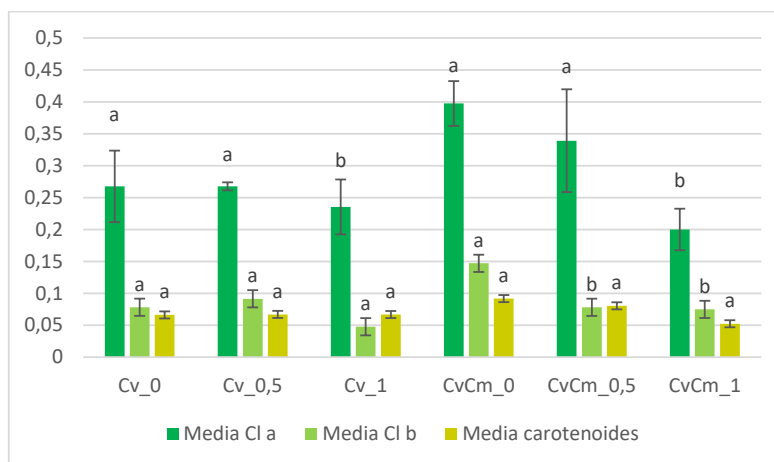


Figura 6. Resultados en pg.cél^{-1} dos pigmentos de *Chlorella vulgaris* (sola e en co-cultivo cos protalos) respecto ás concentracións ensaiadas de azitromicina do día 5 de experimento. Cv_ fai referencia aos cultivos puros de *Chlorella* e CvCm_ aos co-cultivos cos protalos.

No día dez de ensaio coa microalga, os resultados (Figura 7) son moi distintos aos anteriores. Ambos os tres pigmentos amosan diferenzas significativas ante a exposición ao antibiótico (un descenso do 19, 9,7 e 5,77% respectivamente). Tamén os tres reflicten diferenzas significativas ante a combinación do antibiótico e o protalo; onde a clorofila a e os carotenoides sofren un aumento moito máis acusado.

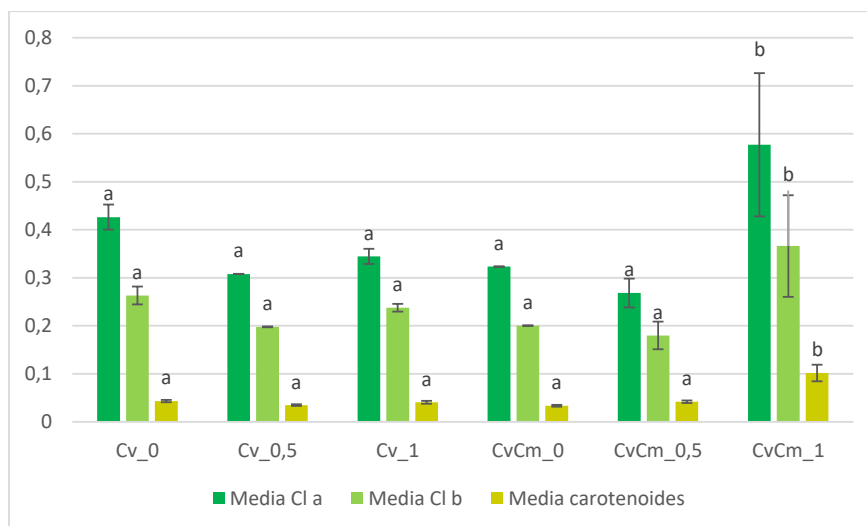


Figura 7. Resultados en pg.cél^{-1} dos pigmentos de *Chlorella vulgaris* (sola e en co-cultivo cos protalos) respecto ás concentracións ensaiadas de azitromicina do día 10 de experimento. Cv_ fai referencia aos cultivos puros de *Chlorella* e CvCm_ aos co-cultivos cos protalos.

No canto dos protalos (Figura 8), no ensaio a cinco días a casuística é totalmente diferente á de *Chlorella*, só a clorofila a ve a súa produción estimulada significativamente respecto ó control en case un 78% pola azitromicina e ningún dos tres pigmentos se ve afectado na interacción alga-antibiótico, este aumento porcentual é moi amplo e pode deberse ás desviacións estándar elevadas que posúen estas medidas. Porén os carotenoides si reflicten afectación ao atoparse en co-cultivo con *Chlorella*.

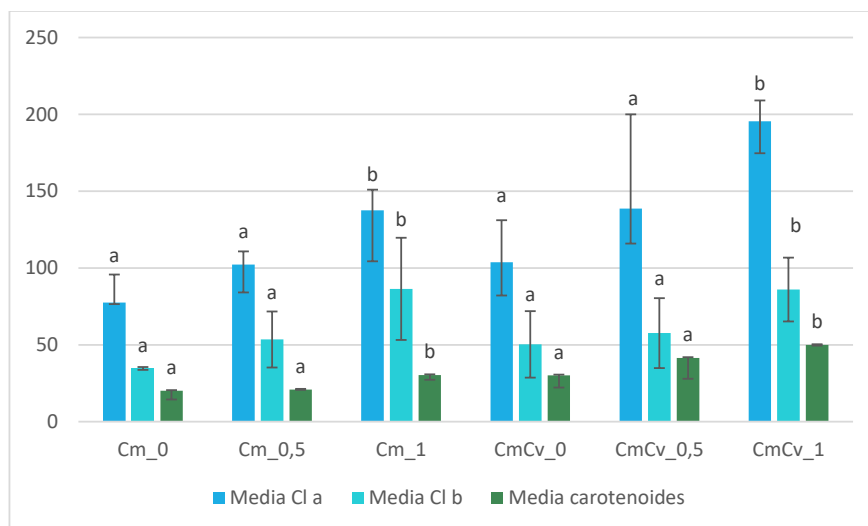


Figura 8. Resultados en $\mu\text{g.g}$ de protalo⁻¹ dos pigmentos de *Culcita macrocarpa* (sos e en co-cultivo coa microalga) respecto ás concentracións ensaiadas de azitromicina do día 5 de experimento. Cm_ fai referencia aos cultivos puros de *Culcita macrocarpa* e CmCv_ aos co-cultivos coa microalga.

No día dez de ensaio, os resultados (Figura 9) son completamente distintos, ningún deles amosa cambios na afectación coas concentracións crecentes de azitromicina e tampouco ningún reacciona ante a interacción da microalga co antibiótico.

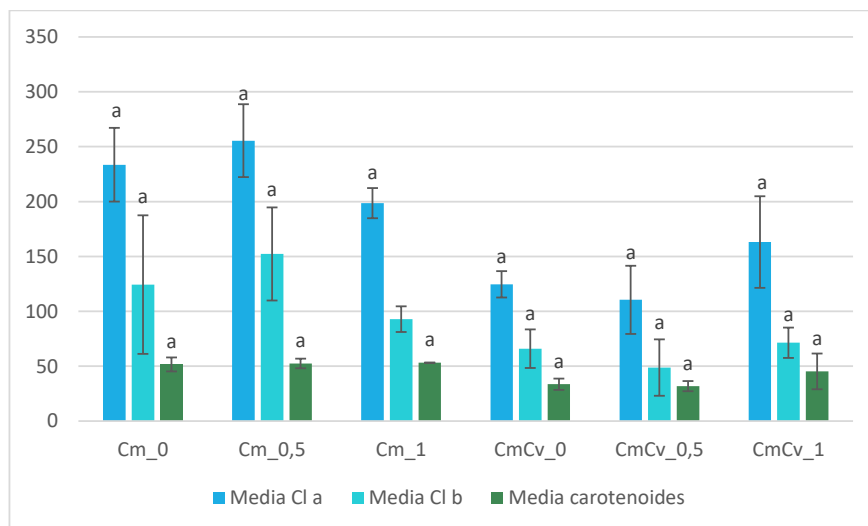


Figura 9. Resultados en $\mu\text{g.g}$ de protalo⁻¹ dos pigmentos de *Culcita macrocarpa* (sos e en co-cultivo coa microalga) respecto ás concentracións ensaiadas de azitromicina do día 10 de experimento. Cm_ fai referencia aos cultivos puros de *Culcita macrocarpa* e CmCv_ aos co-cultivos coa microalga.

Os efectos tóxicos dos fármacos e outras sustancias sobre as microalgas están amplamente testados. En especies como *Stephanodiscus hantzschii* Grunow (unha diatomea), o contido celular de clorofila *a* decrecía na exposición a concentracións maiores que 1mg.L^{-1} de BPA (bisfenol A) , mentres que a concentracións inferiores o efecto non era significativo (Li et al., 2009). Noutra como *Scenedesmus rubescens* P.J.L.Dangeard, tras tratamentos dunha semana con ibuprofeno tamén se registrou un descenso na produción de clorofilas, neste caso da *a* e da *b* (Moro et al., 2014).

En *Scenedesmus obliquus* Turpin, avaliouse os efectos negativos na alga no tratamento cun herbicida, o flazasulfuron; e viuse que o marcador máis sensible ao contaminante era a clorofila *a*, que rexistrou unha inhibición da súa produción (Couderchet & Vernet, 2003).

A reacción dos protalos é bastante complexa e os distintos pigmentos reaccionan de maneira moi dispar, a redución da produción dos mesmos cando se atopa en co-cultivo, podería ser causa do aumento desmedido de *Chlorella*; o crecemento da microalga reduce a cantidade de luz que chega aos protalos, coa conseguinte caída na produción dos pigmentos. Polo tanto, poderíase estar a falar dun erro no deseño do experimento onde é dificultoso diferenciar se as variacións dos parámetros son froito do efecto do AZT ou da intensidade lumínica que reciben.

5.4. EFECTO CITOTÓXICO SOBREA ACTIVIDADE FOTOSINTÉTICA NAS CÉLULAS DE *C. VULGARIS* E NOS PROTALOS DE *C. MACROCARPA*

O rendemento fotosintético é un dos parámetros máis afectados nas microalgas en ensaios de ecotoxicidade (Ma et al., 2006). Por elo mediuse de que maneira se vía afectada a súa eficiencia coa azitromicina.

Os resultados do día cinco de ensaio con *Chlorella* reflicten que si se atopan diferenzas significativas respecto ao descenso da actividade fotosintética producida pola exposición ao macrólido; así como unha afectación polas condicións de co-cultivo con protalos. No día dez estas diferenzas non fan máis que acentuarse, producíndose unha importante inhibición do rendemento fotosintético a concentracións de $1\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ (do 38% nas microalgas en co-cultivo) (Figura 10).

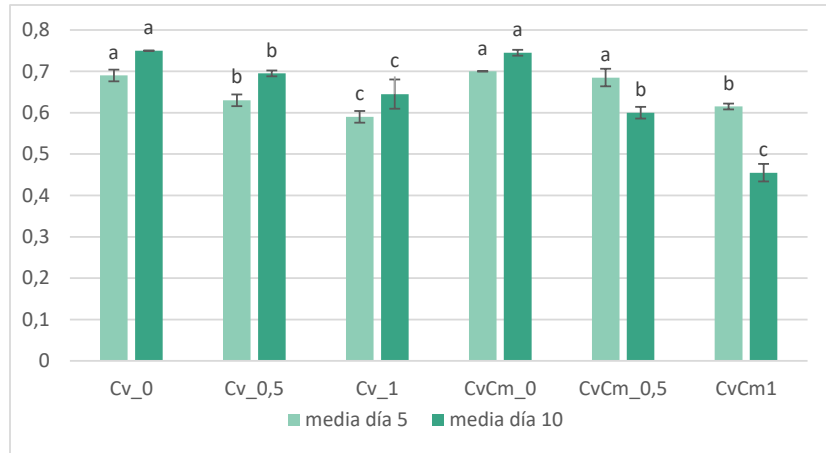


Figura 10. Resultados da actividade fotosintética de *Chlorella vulgaris* (sola e en co-cultivo cos protalos) respecto ás concentracións ensaiadas de azitromicina do día 5 de experimento. Cv_ fai referencia aos cultivos puros de *Chlorella* e CvCm_ aos co-cultivos cos protalos.

Porén, o rendemento do fotosistema no protalo non parece mostrar esas diferenzas tan claras. No día cinco ningún dos parámetros amosa diferenzas significativas con respecto ao control, nin lle afecta a exposición a azitromicina nin a presenza de *Chlorella* no cultivo con eles.

No día dez do ensaio, o único que varía é que a contaminación do antibiótico si que chega a producir descensos significativos no rendemento dos protalos (Figura 11) que chegan a ser do 20,10% en co-cultivo.

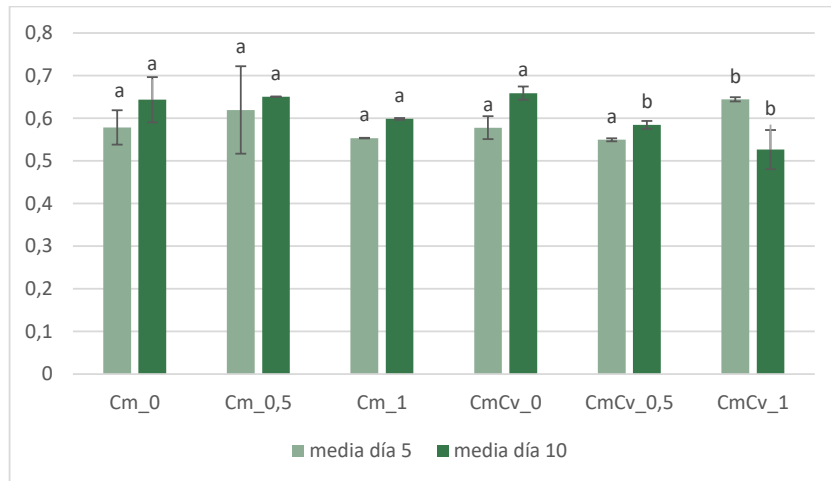


Figura 11. Resultados da actividade fotosintética dos protalos de *Culcita macrocarpa* (sos e en co-cultivo coa microalga) respecto ás concentracións ensaiadas de azitromicina do día 5 de experimento. Cm_ fai referencia aos cultivos puros de *Culcita macrocarpa* e CmCv_ aos co-cultivos coa microalga.

Nun estudo realizado con *Microcystis flos-aquae* Wittrock no que se testaba a exposición á eritromicina, os parámetros de fluorescencia descendían

significativamente ao aumentar o tempo de exposición e a concentración da eritromicina, indicando así que a fotosíntese se vía inhibida (Wan et al., 2015).

Os antibióticos afectan á fotosíntese impedindo a formación dos cloroplastos, así como á biosíntese proteica e tamén á produción de clorofilas; este descenso de clorofilas debilita a capacidade do fotosistema e o metabolismo celular (Liu et al., 2018). Porén no estudo realizado con *Raphidocelis subcapitata* Korshikov expoñéndoa a concentracións de eritromicina e sulfametoxazol, demostrouse que pese a ter unha elevada toxicidade no rendemento fotosintético, os danos eran moito máis acusados no crecemento (Aderemi et al., 2021)

5.5. ANÁLISE CONXUNTA

Os resultados obtidos neste traballo suxiren a necesidade dunha maior cantidade de réplicas por medición, que axudaría a discernir a casuística das medicións obtidas.

No caso do peso seco de *Chlorella* que experimenta en todo momento un marcado ascenso, puidera deberse á metabolización do antibiótico por parte do protalo que produciría residuos que afectaría á microalga. Asemade, estes datos unidos ao decrecemento da taxa de crecemento de *C. vulgaris* refiren tamén a posibilidade de que se trate por outra parte dunha estimulación por parte do AZT no aumento do tamaño das células con respecto ás do control, aínda que logo a presenza do antibiótico provoque un bloqueo na división celular.

O peso húmido de *C. macrocarpa* presenta resultados pouco coherentes, que poden ser debidos, como se indicou anteriormente a un erro non secado das mostras ou ben á problemática da redución lumínica derivada do sobrecrecemento da microalga.

No canto dos pigmentos celulares, unha única conclusión é bastante complexa xa que reaccionan de xeitos moi diferentes. No caso de *Chlorella vulgaris* so se ve claro descenso na clorofila *a*, en cambio en *Culcita macrocarpa* é este mesmo pigmento o que maior aumento rexistra, por outra banda a redución dos pigmentos en co-cultivo poderíase atribuír igualmente á competencia lumínica que exerce a microalga. Polo tanto, requiría de maiores réplicas e redeseño para poder discernir se se trata de interferencias co antibiótico ou coa falta de luz.

Amplamente ligado a isto vai o rendemento fotosintético, que en todos os casos presenta resultados coherentes co seu descenso, proporcional coas concentracións crecentes de azitromicina. Refléctese por tanto, que *Chlorella* é máis sensible á AZT que os protalos, causa que pode ser derivada do rápido ciclo de vida, así como da interacción co protalo.

Este estudo serve tamén para poñer en relevancia a necesidade de usar como modelos organismos ameazados como *C. macrocarpa*, aos que os contaminantes emerxentes poden estar xa afectando. Neste caso concreto, é de esperar que as poboacións naturais non estean aínda expostas a concentracións como as testadas, que son superiores ás que se poden atopar nas comunidades naturais deste feito que vive en bosques. Aínda que estes CE son ubicuos e están tamén nas augas superficiais, as concentracións detectadas ata o

momento adoitan ser algo máis baixas que as ensaiadas. Por elo, sería interesante a futuro realizar novos ensaios con concentracións inferiores e baixo diferentes condicións de cultivo.

6. CONCLUSIÓNS

A exposición de *Chlorella vulgaris* á azitromicina en diferentes concentracións provoca alteracións significativas en todos os parámetros agás na produción de pigmentos. O rendemento fotosintético é o que maior inhibición experimenta; porén o peso seco celular rexistra un marcado incremento.

Nos protalos de *Culcita macrocarpa* o efecto das concentracións de azitromicina no cultivo provoca a diminución do rendemento fotosintético dos mesmos a altas concentracións só a partires do décimo día.

O tratamento con azitromicina dos dous organismos en co-cultivo afecta significativamente aos parámetros de fotosíntese e peso seco celular, mostrando un descenso moito máis acusado que nos cultivos illados de microalga e protalos.

CONCLUSIONES

La exposición de *Chlorella vulgaris* a la azitromicina en diferentes concentraciones provoca alteraciones significativas en todos los parámetros excepto en la producción de pigmentos. El rendimiento fotosintético es lo que mayor inhibición experimenta; sin embargo, el peso seco celular registra un marcado incremento.

En los protalos de *Culcita macrocarpa* el efecto de las concentraciones de azitromicina en el cultivo provoca la merma del rendimiento fotosintético de los mismos a altas concentraciones sólo a partir del décimo día.

El tratamiento con azitromicina de los dos organismos en con el-cultivo afecta significativamente a los parámetros de fotosíntesis y peso seco celular, mostrando un descenso mucho más acusado que nos cultivos aislados de microalga y protalos.

CONCLUSIONS

Exposure of *Chlorella vulgaris* to azithromycin at different concentrations causes significant alterations in all parameters except pigment production. Photosynthetic yield is most inhibited; however, cell dry weight shows a marked increase.

In *Culcita macrocarpa* prothals, the effect of azithromycin concentrations in the culture causes a decrease in photosynthetic yield at high concentrations only from the tenth day onwards.

Azithromycin treatment of the two organisms in co- culture significantly affects photosynthetic parameters and cell dry weight, showing a much more pronounced decrease than isolated cultures of microalgae and prothals.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aderemi, A. O., Roberts, J., Hunter, C., & Pahl, O. (2021). Microalgal Exposure to Human Antibiotics Triggers Similarities in Growth and Photosynthetic Responses. *Journal of Environmental Protection*, 12(08), 509–525. <https://doi.org/10.4236/jep.2021.128032>
- Amigo, J. (2005). Los helechos en el noroeste ibérico y su interés para la conservación. Recursos Rurais, Serie Cursos e Monografías, 2: 11-22. Instituto de Biodiversidade Agraria e Desenvolvimento Rural (IBADER), Lugo.
- Aubakirova, B. N. (2017). *The effect of five antibiotics to the growth of chlorella species*.
- Ballesteros, D., Estrelles, E., Walters, C., & Ibars, A. M. (2012). Effects of temperature and desiccation on ex situ conservation of nongreen fern spores. *American journal of botany*, 99(4), 721–729.
- Banić Tomišić, Z. (2021). The Story of Azithromycin. *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, 60(12), 2011, 603-617. https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=110890
- Bañares Baudet, Á., Blanca, G., Güemes Hera, J., Moreno Saiz, J. C., & Ortiz, S. (Eds.) (2004). *Atlas y libro rojo de la flora vascular amenazada de España*. TRAGSA.
- Becker, E.W. (1994). *Microalgae. Biotechnology and Microbiology*. 293 pp. Cambridge Univ. Press, Cambridge
- Bourrelly, P. (1990). *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. I. Les Algues vertes*. 512 pp. Boubée, N. & Cie, Paris.
- Brummitt, N., Aletrari, E., Syfert, M. M., & Mulligan, M. (2016). Where are threatened ferns found? Global conservation priorities for pteridophytes. *Journal of Systematics and Evolution*, 54(6), 604–616. <https://doi.org/10.1111/jse.12224>
- Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, M. P., & Saoncella, A. (2001). An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Research*, 35(1), 69–76. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00223-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00223-2)
- Castiglioni, S., Davoli, E., Riva, F., Palmiotto, M., Camporini, P., Manenti, A., & Zuccato, E. (2018). Mass balance of emerging contaminants in the water cycle of a highly urbanized and industrialized area of Italy. *Water Research*, 131, 287–298. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.047>
- Castroviejo, S. (coord. gen.) (1986-2012). *Flora iberica* 1-8, 10-15, 17-18, 21.

Real Jardín Botánico, CSIC.

- Čelić, M., Gros, M., Farré, M., Barceló, D., & Petrović, M. (2019). Pharmaceuticals as chemical markers of wastewater contamination in the vulnerable area of the Ebro Delta (Spain). *Science of the Total Environment*, 652, 952–963. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.290>
- Couderchet, M., & Vernet, G. (2003). Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55, 271–277. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00064-7](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00064-7)
- Delgado, A. J., & Plaza, L. (2006). Helechos amenazados de Andalucía. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal/documents/20151/5395847/libro_helechos.pdf/f59dfb40-41f3-9608-7e13-f8c3a26a9a42?t=1620282998906
- Díaz-Cruz, M. S., López De Alda, M. J., & Barceló, D. (2003). Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22(6), 340–351. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00603-4](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00603-4)
- Díaz González, T. E., Fernández-Carvajal Álvarez, C., & Fernández Prieto, J. A. (2004). *Curso de botánica*. Trema
- Fernández Martínez, E. (2019) Análisis de la viabilidad de las esporas en poblaciones del helecho relicto amenazado *Culcita macrocarpa*. [Trabajo de fin de grado, Universidade da Coruña]. RUC, Repositorio da Universidade da Coruña. <http://hdl.handle.net/2183/24238>
- Fu, L., Huang, T., Wang, S., Wang, X., Su, L., Li, C., & Zhao, Y. (2017). Toxicity of 13 different antibiotics towards freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and their modes of action. *Chemosphere*, 168, 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.043>
- Godoy, M., & Sánchez, J. (2020). Antibiotics as Emerging Pollutants in Water and Its Treatment. In *Antibiotic Materials in Healthcare*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820054-4.00012-4>
- González-Gaya, B. (2021). *Invisible pollution : emerging marine pollutants. Mètode Science Studies Journal*, 11, 183–191.
- González Zuarth, C. A., Vallarino, A., Pérez Jiménez, J. C., & Low Pfeng, A. M. (Eds.). (2014). *Bioindicadores: Guardianes de nuestro futuro ambiental*. ECOSUR; INECC
- Kessler, M., Moran, R. C., Mickel, J. T., Matos, F. B., & Smith, A. R. (2018). Prodomus of a fern flora for Bolivia. XXXV. Dryopteridaceae. *Phytotaxa*, 353(1), 1–114. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.353.1>
- Kessler, E. (1986). Limits of growth of five *Chlorella* species in the presence of toxic heavy metals. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 73, 123-128.
- Kim, S. D., Cho, J., Kim, I. S., Vanderford, B. J., & Snyder, S. A. (2007). Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in

- South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research*, 41(5), 1013–1021. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.034>
- Koumaki, E., Mamais, D., Noutsopoulos, C., Nika, M. C., Bletsou, A. A., Thomaidis, N. S., Eftaxias, A., & Stratogianni, G. (2015). Degradation of emerging contaminants from water under natural sunlight: The effect of season, pH, humic acids and nitrate and identification of photodegradation by-products. *Chemosphere*, 138, 675–681. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.033>
- Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F., & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 1–46. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.05.012>
- Liu, L., Wu, W., Zhang, J., Lv, P., Xu, L., & Yan, Y. (2018). Progress of research on the toxicology of antibiotic pollution in aquatic organisms. *Acta Ecologica Sinica*, 38(1), 36–41. <https://doi.org/10.1016/J.CHNAES.2018.01.006>
- Ma, J., Wang, S., Wang, P., Ma, L., Chen, X., & Xu, R. (2006). Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(3), 456–462. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.12.001>
- Martínez, E.V. (2020) *Os fieitos relictos do Terciario en Galicia: análise filoxenética e estudo ecolóxico de poboacións de *Culcita macrocarpa* Presl. na Península Ibérica*. [Traballo de fin de mestrado]. Universidade da Coruña. <http://hdl.handle.net/2183/26321>
- Martínez, I., Soto, J., & Lahora, A. (2020). Antibióticos como contaminantes emergentes. Riesgo ecotoxicológico y control en aguas residuales y depuradas. *Revista Científica de Ecología y Medio Ambiente*, 29(3), Article 2070. <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/2070>
- Matamoros, V., Gutiérrez, R., Ferrer, I., García, J., & Bayona, J. M. (2015). Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study. *Journal of Hazardous Materials*, 288, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.002>
- Moro, I., Matozzo, V., Piovan, A., Moschin, E., & Dalla Vecchia, F. (2014). Morpho-physiological effects of ibuprofen on *scenedesmus rubescens*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38(2), 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.06.005>
- Murray, K. E., Thomas, S. M., & Bodour, A. A. (2010). Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment.

Environmental Pollution, 158(12), 3462–3471.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.08.009>

- Näslund, J., Hedman, J. E., & Agestrand, C. (2008). Effects of the antibiotic ciprofloxacin on the bacterial community structure and degradation of pyrene in marine sediment. *Aquatic Toxicology*, 90(3), 223–227.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.09.002>
- Ospina Alvarez, N. P. J. E. (2004). Alternativas de Monitoreo de Calidad de Aguas: Algas como Bioindicadores. *Acta Nova*, 2(4), 513–517.
- Peña-Guzmán, C., Ulloa-Sánchez, S., Mora, K., Helena-Bustos, R., Lopez-Barrera, E., Alvarez, J., & Rodriguez-Pinzón, M. (2019). Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. *Journal of Environmental Management*, 237(December 2018), 408–423.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.100>
- Pham, T.-T., Proulx, S., & Canada, E. (1997). PCBs and PAHs in the Montreal Urban Community (Quebec, Canada) wastewater treatment plant and in the effluent plume in the St Lawrence River. *Water Research*, 31 (8), 1887-1896.
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)0025-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)0025-0)
- Quintanilla, L. G., Pajarón, S., Pangua, E., & Amigo, J. (2000). Effect of temperature on germination in northernmost populations of *Culcita macrocarpa* and *Woodwardia radicans*. *Plant Biology*, 2(6), 612–617.
<https://doi.org/10.1055/s-2000-16638>
- Quintanilla, L. G., Pajarón, S., Pangua, E., & Amigo, J. (2007). Allozyme variation in the sympatric ferns *Culcita macrocarpa* and *Woodwardia radicans* at the northern extreme of their ranges. *Plant Systematics and Evolution*, 263(3–4), 135–144. <https://doi.org/10.1007/s00606-006-0486-x>
- Quintanilla, L. G., Pangua, E., Amigo, J., & Pajarón, S. (2005). Comparative study of the sympatric ferns *Culcita macrocarpa* and *Woodwardia radicans*: sexual phenotype. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 200 (2), 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2004.07.003>
- Ramos Alvariño, C. (2009). Medicamentos de consumo humano en el agua, propiedades físico-químicas. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 47(2).
- Roberts, P. H., & Thomas, K. V. (2006). The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of the Total Environment*, 356(1–3), 143–153.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.04.031>
- Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J. A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M. J., Agüera, A., & Fernández-Alba, A. R. (2010). Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research*, 44(2), 578–588.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.07.004>
- Sant' Anna, L. (1984) Chlorococcales (Chlorophyceae). 62 pp. Cramer, J. (Ed.), Berlin, Germany.

- Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., & Cid, Á. (2014). Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. *Marine Environmental Research*, 101(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.07.011>
- Soeder, C.J., Hegewald, E. (1988). Scenedesmus. pp. 59-84. En: Micro-algal Biotechnology. Borowitzka, L.J. (Eds.), Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Tousova, Z., Oswald, P., Slobodnik, J., Blaha, L., Muz, M., Hu, M., Brack, W., Krauss, M., Di Paolo, C., Tarcai, Z., Seiler, T. B., Hollert, H., Koprivica, S., Ahel, M., Schollée, J. E., Hollender, J., Suter, M. J. F., Hidasí, A. O., Schirmer, K., ... Schulze, T. (2017). European demonstration program on the effect-based and chemical identification and monitoring of organic pollutants in European surface waters. *Science of the Total Environment*, 601–602, 1849–1868. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.032>
- Turic, E. (2010). *Farmacocinetica De Azitromicina En Vacas Lecheras Holando Argentino*. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional de La Plata]. SEDICI, Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/61118>
- Van Wezel, A. P., & Van Vlaardingen, P. (2004). Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquatic Toxicology*, 66(4), 427–444. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2003.11.003>
- Vannini, C., Domingo, G., Marsoni, M., De Mattia, F., Labra, M., Castiglioni, S., & Bracale, M. (2011). Effects of a complex mixture of therapeutic drugs on unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquatic Toxicology*, 101(2), 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.011>
- Verma, S.C. (2001). Genetic implications of diversity in gametophyte biology and isolate potential of homosporous ferns. *Phytomorphology*, 51, 33–39
- Vogelsang, C., Grung, M., Gunnar Jantsch, T., Erik Tollefsen, K., & Liltved Å, H. (2006). *Occurrence and removal of selected organic micropollutants at mechanical, chemical and advanced wastewater treatment plants in Norway*. *Water research*, 40(19), 3559-3570 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.07.022>
- Wan, J., Guo, P., Peng, X., & Wen, K. (2015). Effect of erythromycin exposure on the growth, antioxidant system and photosynthesis of *Microcystis flos-aquae*. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 778–786. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2014.10.026>
- Zuckerman, J. M. (2000). The newer macrolides: Azithromycin and clarithromycin. *Infectious Disease Clinics of North America*, 14(2), 449–462. [https://doi.org/10.1016/S0891-5520\(05\)70257-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5520(05)70257-9)