



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Citotoxicidad y retirada de microcontaminantes emergentes en la microalga marina *Dunaliella tertiolecta*

Citotoxicidade e retirada de microcontaminantes emerxentes na microalga mariña *Dunaliella tertiolecta*

Cytotoxicity and removal of emerging microcontaminants in the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*

Jorge Lejo Santiago

Curso: 2020 – 2021

Convocatoria: Julio

Directora: Carmen Rioboo Blanco

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Profa. Carmen Rioboo Blanco por ser mi tutora en este trabajo, por su orientación, revisión y ayuda a lo largo de mi Trabajo de Fin de Grado. También por hacer más amenas las esperas en el laboratorio.

Dar las gracias a mis compañeros y compañeras por estos años de convivencia, sin vosotros mi experiencia no hubiera sido tan satisfactoria. En especial a Fran por aguantarme durante la realización de este trabajo.

Por último, quiero dar las gracias a mi madre y a mi abuelo por siempre apoyarme y animarme a continuar con mi camino en los buenos y malos momentos. Sin vuestro apoyo nunca hubiera sido capaz de estar donde estoy ahora.

Contenido

Abreviaturas	5
Resumen.....	6
Resumo	7
1. Introducción	9
1.1 Retardantes de llama	10
1.2 Microalgas en ensayos de toxicidad	11
1.3 Análisis de biomarcadores mediante citometría de flujo	11
1.4 Estudio de retirada de contaminantes del medio	12
2. Objetivos	13
3. Material y métodos	14
3.1 Descripción de <i>Dunaliella tertiolecta</i>	14
3.2 Cultivo de <i>Dunaliella tertiolecta</i>	14
3.3 Análisis mediante citometría de flujo.....	14
3.4 Determinación de la densidad celular.....	15
3.5 Análisis de la viabilidad celular	15
3.6 Análisis de la vitalidad celular	16
3.7 Análisis de los niveles intracelulares de ROS.....	16
3.8 Análisis del potencial de membrana mitocondrial	17
3.9 Análisis del pH intracelular	17
3.10 Análisis del potencial de membrana citoplasmática	17
3.11 Análisis de la capacidad de biocaptación de OPRFs de <i>D. tertiolecta</i>	18
3.12 Análisis estadístico.....	18
3.13 Diseño experimental.....	19
4. Resultados y discusión.....	21
4.1 Retirada de OPRFs.....	21
4.2 Efecto de los OPRFs sobre el crecimiento de los cultivos de <i>D.tertiolecta</i>	22
4.3 Efecto de los OPRFs sobre la viabilidad de los cultivos de <i>D.tertiolecta</i>	23
4.4 Efecto de los OPRFs sobre la vitalidad de los cultivos de <i>D.tertiolecta</i>	23
4.5 Efecto de los OPRFs sobre los niveles intracelulares de ROS de los cultivos de <i>D.tertiolecta</i>	24
4.6 Efecto de los OPRFs sobre el potencial de membrana mitocondrial de los cultivos de <i>D.tertiolecta</i>	25
4.7 Efecto de los OPRFs sobre el pH intracelular de los cultivos de <i>D.tertiolecta</i>	26



4.8 Efecto de los OPRFs sobre el potencial de membrana citoplasmática de los cultivos de D.tertiolecta.....	26
5. Conclusiones	28
5. Conclusións	29
5. Conclusions	30
6. Bibliografía	31
Anexos	34

Abreviaturas

Contaminantes de Interés Emergentes (CEC)

Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA)

Retardantes de Llama Organofosforados (OPRFs)

Persistentes, Bioacumulativos y/o Tóxicos (PBT)

Microextracción Líquido-Líquido asistida por Vórtex (VALLME)

Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (GC-MS)

Inyección con Temperatura Programada (PTV)

Cultivos control sin contaminantes en la primera exposición (C)

Cultivos tratados con contaminantes en la primera exposición (T)

Cultivos control sin contaminante en la segunda exposición (C')

Cultivos tratados con contaminantes en la primera y en la segunda exposición (TT)

Cultivos control sin contaminantes en la primera exposición, pero tratados con contaminantes en la segunda exposición (CT)

Forward scattered light (FCS)

Side scattered light (SSC)

Yoduro de propidio (PI)

Diacetato de fluoresceína (FDA)

Reactive oxygen species (ROS)

Dihidrorodamina123 (DHR)

1,1',3,3'-Tetraetil-5,5',6,6'-tetracloroimidacarbocianina (JC1)

2',7'-Bis-(2-Carboxietil)-5-(y-6)-Carboxifluoresceina (BCECF)

bis-(1,3-ácido dibutilbarbiturico) trimetino oxonol (DiBAC4(3))

Resumen

Los contaminantes emergentes, como los aditivos de plásticos, representan un problema medioambiental en los ecosistemas acuáticos. Particularmente preocupante es la evidencia de que sus habitantes, como las microalgas, se encuentran expuestos, no a un único compuesto, si no a mezclas heterogéneas de contaminantes, siendo además habitual que se produzcan descargas repetidas en aguas costeras cercanas a núcleos urbanos y/o industriales.

En base a esto, en el presente trabajo se estudió la potencial citotoxicidad sobre la microalga marina *Dunaliella tertiolecta* de una mezcla de 5 retardantes de llama organofosforados (TiBP, TnBP, TCPP (Σisómeros), TDCPP y TPPO), diseñados como aditivos alternativos de menor toxicidad a los utilizados en los últimos años. Para ello, se expusieron cultivos de la microalga a concentraciones de 8 (EC₂₅) y 16 (EC₅₀) µg/mL analizando mediante citometría de flujo diferentes biomarcadores de toxicidad (viabilidad, vitalidad, niveles intracelulares de ROS, pH intracelular, potencial de membrana mitocondrial y potencial de membrana citoplasmática). Los ensayos se realizaron con una primera exposición a 8 µg/mL de la mezcla de OPRFs, analizando los resultados a las 3 y 48 horas. Además, se estudió la retirada de los 5 contaminantes del medio por parte de *D. tertiolecta*, cuantificándolos mediante microextracción líquido-líquido asistida por vórtice realizando la separación y detección con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo con inyección con temperatura programada (VALLME-PTV-GC-MS-MS). Finalmente, para simular una nueva descarga de contaminantes, los cultivos previamente tratados a 8 µg/mL de la mezcla se sometieron a una segunda exposición de 48h a 16 µg/mL, repitiéndose los análisis referidos.

Los resultados obtenidos muestran que la exposición a la mezcla de 5 OPRFs provoca citotoxicidad sobre la microalga *D. tertiolecta*, afectando significativamente a todos los biomarcadores ensayados y el análisis de los niveles intracelulares de ROS ha sido el más afectado. Además, la retirada de los compuestos del medio de cultivo microalgal se observa ya a las 3 horas de la exposición a la mezcla de contaminantes, siendo los clorados (TCPP y TDCPP) los que presentan una menor retirada. Por último, una segunda exposición a la mezcla de contaminantes produce una toxicidad más severa en las células microalgales reexpuestas en comparación con las alteraciones registradas en las microalgas expuestas por primera vez.

Palabras clave: OPRFs, aditivos, citometría de flujo, citotoxicidad, biocaptación, agua de mar, *D. tertiolecta*.

Resumo

Os contaminantes emerxentes, como os aditivos de plásticos, representan un problema medioambiental nos ecosistemas acuáticos. Particularmente preocupante é a evidencia de que os seus habitantes, como as microalgas, encóntranse expostos, non a un único composto, se non a mesturas heteroxéneas de contaminantes, sendo ademais habitual que se produzan descargas repetidas en augas costeiras próximas a núcleos urbanos e/ou industriais.

En base a isto, no presente traballo estudouse a potencial citotoxicidade sobre a microalga mariña *Dunaliella tertiolecta* de unha mestura de 5 retardantes de chama organofosforados (TiBP, TnBP, TCPP (Σisómeros), TDCPP e TPPO), deseñados como aditivos alternativos de menor toxicidade aos utilizados nos últimos anos. Para elo, expuxéronse cultivos de la microalga a concentracións de 8 (EC₂₅) y 16 (EC₅₀) µg/mL analizando mediante citometría de fluxo diferentes biomarcadores de toxicidade (viabilidade, vitalidade, niveis intracelulares de ROS, pH intracelular, potencial de membrana mitocondrial e potencial de membrana citoplasmática). Os ensaios se realizaron cunha primeira exposición a 8 µg/mL da mestura de OPRFs, analizando os resultados ás 3 e 48 horas. Ademais, estudouse a retirada dos 5 contaminantes do medio por parte de *D. tertiolecta*, cuantificándoos mediante microextracción líquido-líquido asistida por vórtice realizando a separación e detección con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de triplo cuadrupolo con inxección con temperatura programada (VALLME-PTV-GC-MS-MS). Finalmente, para simular una nova descarga de contaminantes, os cultivos previamente tratados a 8 µg/mL da mestura sometéronse a unha segunda exposición de 48h a 16 µg/mL, repetíndose los análises referidos.

Os resultados obtidos mostran que la exposición á mestura de 5 OPRFs provoca citotoxicidade sobre a microalga *D. tertiolecta*, afectando significativamente a todos os biomarcadores ensaiados e o análise dos niveis intracelulares de ROS foi o máis afectado. Ademais, a retirada dos compostos do medio de cultivo microalgal observase xa ás 3 horas de la exposición á mestura de contaminantes, sendo os clorados (TCPP e TDCPP) os que presentan unha menor retirada. Por último, unha segunda exposición á mestura de contaminantes produce unha toxicidade máis severa nas células microalgais reexpostas en comparación coas alteracións rexistradas nas microalgas expostas por primeira vez.

Palabras chave: OPRFs, aditivos, citometría de fluxo, citotoxicidade, biocapatación, auga de mar, *D. tertiolecta*.

Abstract

Emerging contaminants, such as plastic additives, represent an environmental problem in aquatic ecosystems. Of particular concern is the evidence that their inhabitants, such as microalgae, are exposed, not to a single compound, but to heterogeneous mixtures of pollutants, and repeated discharges are common in coastal waters near urban and/or industrial centers.

Based on this, in the present work the potential cytotoxicity on the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* of a mixture of 5 organic phosphorus flame retardant (TiBP, TnBP, TCPP (Σ isomers), TDCPP and TPPO), designed as alternative additives of lower toxicity to those used in recent years, was studied. For this purpose, cultures of the microalgae were exposed to concentrations of 8 (EC₂₅) and 16 (EC₅₀) $\mu\text{g/mL}$ analyzing by flow cytometry different biomarkers of toxicity (viability, vitality, intracellular ROS levels, intracellular pH, mitochondrial membrane potential and cytoplasmic membrane potential). The assays were performed with a first exposure to 8 $\mu\text{g/mL}$ of the OPRFs mixture, analyzing the results at 3 and 48 hours. In addition, the removal of the 5 contaminants from the medium by *D. tertiolecta* was studied, quantifying them by vortex-assisted liquid-liquid microextraction performing separation and detection with programmable temperature vaporize-gas chromatography-mass spectrometry of triple quadrupole (VALLME-PTV-GC-MS-MS). Finally, to simulate a new contaminant discharge, the cultures previously treated at 8 $\mu\text{g/mL}$ of the mixture were subjected to a second 48h exposure at 16 $\mu\text{g/mL}$, repeating the referred analyses.

The results obtained show that exposure to the mixture of 5 OPRFs causes cytotoxicity on the microalga *D. tertiolecta*, significantly affecting all biomarkers tested and being the analysis of intracellular ROS levels the most affected. In addition, the removal of compounds from the microalgal culture medium is observed as early as 3 hours after exposure to the contaminant mixture, with chlorinated compounds (TCPP and TDCPP) showing the least removal. Finally, a second exposure to the contaminant mixture produces a more severe toxicity in the re-exposed microalgal cells compared to the alterations recorded in the microalgae exposed for the first time.

Key words: OPRFs, additives, Flow cytometry, citotoxicity, biocapture, seawater, *D. tertiolecta*.

1. Introducción

El desarrollo industrial y el crecimiento poblacional humano han conllevado que en los últimos años hayan aparecido un gran número de nuevas sustancias contaminantes cuya presencia en los medios naturales genera una gran preocupación tanto a nivel científico como social. Frente a esta situación se han desarrollado técnicas analíticas cada vez más eficientes en la detección de estos contaminantes ¹.

Los contaminantes de interés emergente (CEC; *contaminants of emerging concern*) representan el conjunto de contaminantes antropogénicos que han visto aumentada su relevancia durante los últimos años ya que pueden afectar a la salud humana y/o ambiental. Representan una amenaza sanitaria y medioambiental ya que incluso en pequeñas cantidades pueden provocar importantes daños. Dentro de esta categoría encontramos microplásticos, productos farmacéuticos, hormonas, pesticidas, productos de higiene personal, aditivos de plásticos, etc. Estos compuestos pueden provenir de diferentes orígenes entre los que se encuentran desechos industriales, vertidos agrarios, desechos domésticos y residuos generados en laboratorios y hospitales ^{1,2}.

Los CEC se han encontrado en diferentes lugares y tipos de muestras, llegando a ser detectados en alimentos y en agua de consumo. En los últimos años se ha observado un notable aumento de la presencia de CEC en aguas superficiales, tanto continentales como oceánicas, representando un grave problema a nivel global. Estos contaminantes pueden ser ingeridos por el ser humano no solo de manera directa a través del consumo de agua contaminada, sino también de forma indirecta a través de los alimentos, o de la exposición a través de cosméticos, textiles y otros productos de uso de la vida diaria. Además, los CEC pueden encontrarse en el agua que se usa para regar los campos de cultivos y para la cría de animales destinados al consumo humano, o en los medios acuáticos donde viven los peces, que los ingieren a lo largo de su vida, pudiendo producirse finalmente su biocaptación y transferencia en la cadena trófica hasta llegar al hombre. Por último, a estos contaminantes hay que sumarles sus productos de degradación tras haber sido metabolizados por diferentes organismos ^{2,3}.

Por otra parte, estos compuestos rara vez aparecen aislados, sino que se encuentran junto a muchos otros compuestos de naturaleza similar, por lo que es importante estudiar el efecto que producen las mezclas. Además, las poblaciones de estos ecosistemas están expuestas a vertidos sucesivos, por lo que es necesario analizar el efecto de las sucesivas exposiciones a las mezclas para obtener unas condiciones de ensayo más reales.

El presente trabajo de fin de grado se ha centrado en los aditivos de plásticos, contaminantes emergentes muy presentes en nuestra vida cotidiana, y dentro de

éstos, en los retardantes de llama organofosforados (OPRFs, *organic phosphorus flame retardant*).

1.1 Retardantes de llama

Los retardantes de llama son un tipo de aditivos cuya función es evitar la combustión del material, así como evitar que se extienda una vez iniciada ⁵. Son de especial importancia porque la mayoría de los plásticos desprenden gases tóxicos cuando se produce su combustión, por lo que actualmente se están utilizando para muchas aplicaciones ^{6,7}. Los más extendidos en su momento fueron los compuestos halogenados, pero estos aditivos en general son persistentes, bioacumulativos y/o tóxicos (PBT), por lo que en los últimos años se buscan alternativas más seguras de menor toxicidad que se han empezado a diseñar con la idea de la química verde en mente ⁸. En resumen, los OPRFs conforman un grupo diseñado como alternativa más segura a los retardantes convencionales (halogenados) que actualmente están siendo sustituidos por su alta toxicidad ⁵.

Los retardantes de llama ensayados en el presente trabajo son los siguientes:

- Tri-iso-butilo fosfato (TiBP): el TiBP destaca por ser un agente que evita la formación de espuma. Es similar al TnBP ⁹.
- Tri-n-butilo fosfato (TnBP): este retardante se encuentra en resinas, cementos, tintes fluorescentes y en acabados de suelos. Puede alcanzar el medio acuático a través de los vertidos industriales además de por su uso como agente antiespumante. Se considera biodegradable ⁹ pero presenta toxicidad para los organismos acuáticos y se sospecha que es carcinógeno ¹⁰.
- Tris(cloropropilo)fosfato (TCPP) (Σisómeros): es el retardante clorado más extendido en Europa. Este retardante presenta 3 isómeros distintos que son muy difíciles de separar por lo que se cuantifica la suma de los 3. Al igual que el anterior es capaz de actuar en fase sólida y en fase gaseosa. La degradación de este compuesto es lenta por lo que perdura en el medio. Es considerado como un compuesto carcinógeno por lo que no se recomienda su uso. Aun así, se encuentra en espuma de poliuretano usada para la construcción y para el amueblado ^{5,9}.
- 1,3-Dicloro-2-propanol fosfato (TDCPP): se encuentra en espumas de poliuretano pero solo en aquellas en las que su uso es más eficaz que el TCPP o cuando se quiere una espuma flexible. Se degrada poco en el agua, pero es rápidamente metabolizado por los peces. Aun así, es especialmente tóxico y carcinógeno para el ser humano ^{5,9}.
- Óxido de trifenilfosfina (TPPO): este retardante actúa en fase gaseosa reduciendo los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{H}$ de las llamas. Presenta poca degradación ya que es capaz de actuar como capa protectora del plástico ¹¹. Este óxido es muy resistente frente a la degradación biológica ¹².

Presenta toxicidad para los organismos acuáticos con efectos duraderos¹⁰.

Por lo general estos compuestos tienen una naturaleza hidrofóbica^{5,13} pero algunos se han encontrado en muestras de agua de mar¹⁴. Por ello es importante estudiar su potencial efecto tóxico en organismos representativos de estos hábitats acuáticos, como las microalgas.

1.2 Microalgas en ensayos de toxicidad

Dado su papel como productores primarios en los sistemas acuáticos, los daños que los contaminantes presentes en las aguas, como los OPRFs, pueden producir sobre las microalgas afectarán potencialmente al conjunto del ecosistema. Por ello, el organismo seleccionado para el presente estudio es *Dunaliella tertiolecta*, una microalga marina que recientemente ha empezado a utilizarse como organismo modelo en ensayos de toxicidad¹⁵⁻¹⁸. Esta microalga ha sido utilizada para el estudio de citotoxicidad de metales¹⁵, pesticidas¹⁶, nanopartículas¹⁷ y nanoplásticos¹⁸.

Estos ensayos consisten en el estudio del efecto tóxico producido en las microalgas tras la exposición a uno o más contaminantes. Pero como estas poblaciones no se encuentran expuestas a un único contaminante es importante estudiar el efecto tóxico que estos provocan en las poblaciones tras varias exposiciones. En base a esto, resulta de sumo interés científico estudiar la potencial citotoxicidad que puede provocar la exposición a mezclas de varios contaminantes¹⁶ así como el efecto que puede provocar una segunda reexposición a contaminantes¹⁹, simulando un episodio de varias descargas sucesivas de compuestos al medio.

1.3 Análisis de biomarcadores mediante citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica instrumental que permite el análisis de poblaciones celulares heterogéneas. Se utiliza para diversos estudios entre los cuales se encuentra el conteo de células y el análisis de propiedades y/o funciones de células individuales. Un flujo continuo de células en suspensión ordenadas una a una pasa a través de un haz de luz produciendo la dispersión de la misma o, utilizando fluorocromos, emisión de fluorescencia²⁰. Gracias a su rapidez y sensibilidad de análisis, es una técnica adecuada para los análisis de toxicidad con microorganismos como las microalgas, ya que permite estudiar varios parámetros biológicos célula a célula en un breve periodo de tiempo.

Para el análisis de los diferentes parámetros celulares utilizados como potenciales biomarcadores en este estudio (viabilidad²¹, vitalidad²², niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS; reactive oxygen species)²³, potencial de membrana mitocondrial²⁴, pH intracelular²⁵ y potencial de membrana citoplasmática²⁶) es necesario el uso de diversos fluorocromos,

compuestos capaces de generar fluorescencia al ser excitados. Gracias a ellos, se puede obtener información de la intensidad de fluorescencia emitida por el fluorocromo y, a partir de ella, estudiar diferentes parámetros bioquímicos y fisiológicos en cada una de las células analizadas ^{20,27}.

Los parámetros seleccionados en este trabajo han sido ensayados previamente mediante esta técnica en diversos estudios de toxicidad ^{21,28-31}. Cabe destacar que la potencial citotoxicidad de los OPFRs analizados en este trabajo está escasamente estudiada ya que, a conocimiento de los autores, sólo en el caso del TDCPP se han llevado a cabo ensayos con el uso de microalgas marinas ²³. Además, ninguno de ellos ha sido estudiado utilizando el mismo microorganismo modelo que en este trabajo y en el caso del TCPP y el TPPO no ha sido estudiado su efecto citotóxico sobre ningún organismo.

1.4 Estudio de retirada de contaminantes del medio

Por último, con respecto a la utilización de organismos para la retirada de contaminantes de los medios, diversos microorganismos han sido estudiados para tal fin, entre ellos *D. tertiolecta* ^{32,33}. De hecho, en estudios recientes se ha empezado a utilizar biomasa de microalgas para su retirada ³⁴. Sin embargo, no se han encontrado estudios de biocaptación de estos OPFRs en ningún organismo en las fuentes consultadas.

2. Objetivos

- Determinación de la citotoxicidad de una mezcla de 5 OPRFs (TiBP, TnBP, TCPP (Σ isómeros), TDCPP y TPPO) en el organismo modelo de agua marina *D. tertiolecta* mediante el estudio de varios potenciales biomarcadores (viabilidad, vitalidad, niveles intracelulares de ROS, pH intracelular, potencial de membrana mitocondrial y potencial de membrana citoplasmática) mediante citometría de flujo.
- Determinación de la capacidad de retirada de la microalga modelo *D. tertiolecta* mediante el estudio de la eliminación del medio de cada uno de estos contaminantes utilizando la microextracción líquido-líquido asistida por vórtex (VALLME; *vortex-assited liquid-liquid microextraction*) y determinando estos compuestos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo, realizando una inyección con temperatura programada (PTV-GC-MS-MS).
- Estudio del efecto producido por una segunda exposición a la mezcla de 5 OPRFs, estudiando la citotoxicidad producida y la retirada de contaminantes del medio.

3. Material y métodos

3.1 Descripción de *Dunaliella tertiolecta*

El organismo utilizado ha sido *Dunaliella tertiolecta* obtenido de *The Culture Centre of Algae and Protozoa* (CCAP Escocia, Reino Unido). Esta microalga marina se ha utilizado como organismo modelo en los ensayos de citotoxicidad realizados en el presente estudio^{15,18}. En los últimos años ha empezado a utilizarse para la producción industrial de β -carotenos³⁵.

Se trata de una microalga con células ovoides o elípticas no comprimidas; borde estrecho en la zona anterior a veces formando un ápice puntiagudo, la zona posterior redonda; periplasma estrecho, hialino, bastante firme; cromatóforos campanulados, rugosos, gruesos en los individuos senescentes; seno anterior con ancho variable; pirenoide desde central hasta sub-anal recubierto por una vaina de almidón; estigma central grande y difuso; presenta dos flagelos de entre 1,5 y 2 veces el tamaño de la célula; núcleo pequeño y central. Las células también contienen pequeños glóbulos refractivos distribuidos equitativamente en la célula y en los individuos en fase estacionaria, en la región anterior, gránulos de almidón. Se trata de una especie ampliamente utilizada porque presenta un rápido crecimiento en condiciones de laboratorio³⁶.

3.2 Cultivo de *Dunaliella tertiolecta*

Los cultivos de *D. tertiolecta* se realizaron en agua de mar filtrada por filtros de nitrocelulosa de 0,22 μm de tamaño de poro y enriquecida por los nutrientes aportados por el medio de cultivo GoldMedium (AQUALGAE S.L.).

Los cultivos de mantenimiento se realizaron en botellas Pyrex de 500 mL, de las cuales se tomaron los inóculos para cada experiencia y se mantuvieron en una cámara de temperatura controlada y constante a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y con iluminación de 80 $\mu\text{mol fotón/m}^2\text{s}$ aportada por tubos fluorescentes Philips TLD de 36 W, en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Todos los cultivos se mantuvieron en condiciones de asepsia con aireación constante.

Todos los medios y materiales utilizados para la realización de este trabajo experimental se esterilizaron previamente en un autoclave a 120°C durante 20 minutos.

3.3 Análisis mediante citometría de flujo

Para los análisis mediante citometría de flujo se utilizó un equipo CytoFLEX (Beckam Coulter). Los detectores disponibles en este equipo son FCS (*forward scattered light*, tamaño celular), SSC (*side scattered light*, complejidad intracelular), FITC (FL1, 525 ± 40 nm, fluorescencia verde), PE (FL2, 585 ± 42

nm, fluorescencia amarilla), ECD (FL3, 610 ± 20 nm, fluorescencia naranja), PC5.5 (FL4, 690 ± 50 nm, fluorescencia roja) y PC7 (780 ± 60). La detección se realiza mediante fotodiodos de avalancha. Como fuente de luz se utilizó un láser de 488 nm, analizando por lo menos 10.000 células en cada muestra. El análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa *Kaluza Flow Cytometry Analysis* V.1.1 (Beckman Coulter Inc.).

3.4 Determinación de la densidad celular

Uno de los factores utilizado para determinar la toxicidad de un compuesto es el potencial efecto inhibitorio que produce sobre las tasas de crecimiento de los organismos. Con el uso de la citometría de flujo se obtuvo la densidad celular de cada cultivo, contando el número de células en un volumen determinado, realizando tres réplicas para cada tratamiento. Las células microalgales se seleccionan en función de su tamaño, registrado en el detector FSC y su contenido en clorofila, detectada en el detector FL4, criterio aplicado para todos los parámetros de citometría analizados. Con los datos de densidad celular se calcularon la tasa de crecimiento y la tasa de inhibición para el intervalo de 3 a 48 horas mediante las siguientes ecuaciones:

Tasa de crecimiento

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\ln 2 \cdot (t - t_0)}$$

Donde μ representa la tasa de crecimiento en porcentaje, N_t es el número de células en el cultivo tras t días y N_0 el número inicial de células.

Porcentaje de inhibición

$$I = \frac{\bar{\mu}_{control} - \mu_i}{\bar{\mu}_{control}}$$

Donde I representa el porcentaje de inhibición, $\bar{\mu}_{control}$ la tasa de crecimiento media del control μ_i la tasa de crecimiento para cada tratamiento.

3.5 Análisis de la viabilidad celular

La viabilidad de las células de *D. tertiolecta* expuestas a los diferentes tratamientos se analizó mediante citometría de flujo empleando un fluorocromo altamente utilizado, el yoduro de propidio (PI, *propidium iodide*). Este fluorocromo es un compuesto fluorescente que se intercala entre las cadenas dobles de ácidos nucleicos. Este fluorocromo es incapaz de traspasar las membranas celulares de células vivas, pero al morir la pared pierde su integridad y el yoduro de propidio penetra al interior celular permitiendo identificar la viabilidad de las células²⁷. Por esta razón el PI puede ser usado para discriminar

células viables no fluorescentes (PI-) y células no viables fluorescentes (PI+) mediante citometría de flujo.

La emisión de fluorescencia del PI se analiza en el detector FL3. Se preparan suspensiones celulares con una densidad final de 2×10^5 células/mL en tampón fosfato salino (PBS; *phosphate buffered saline*) estéril y se añaden 2,5 μ L de una solución de 1 mg/mL de PI en PBS. Tras una incubación de 10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, las muestras se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de células viables no fluorescentes (PI-) con respecto al total de células analizadas.

3.6 Análisis de la vitalidad celular

La vitalidad de las células de *D. tertiolecta* expuestas a los diferentes tratamientos se analizó mediante citometría de flujo empleando un fluorocromo altamente utilizado, el diacetato de fluoresceína (FDA, *fluorescein diacetate*). Se trata de un compuesto que es capaz de entrar dentro de las células y, en su interior es hidrolizado convirtiéndose en un compuesto fluorescente. Esta característica nos permite utilizar el FDA para discriminar las células con niveles altos de vitalidad (FDA+) con respecto al total de células analizadas ³⁷.

La emisión de fluorescencia del FDA se analiza en el detector FL1. Se preparan suspensiones celulares con una densidad final de 2×10^5 células/mL en tampón PBS estéril y se añaden 5 μ L de una solución de 50 μ g/mL de FDA en dimetilsulfóxido (DMSO; dimethyl sulfoxide). Tras una incubación de 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, las muestras se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de células con vitalidad (FDA+) con respecto al total de células analizadas.

3.7 Análisis de los niveles intracelulares de ROS

Los niveles intracelulares de ROS (*reactive oxygen species*) de las células de *D. tertiolecta* expuestas a los diferentes tratamientos se analizó mediante citometría de flujo empleando el fluorocromo Dihidrorodamina123 (DHR). Este fluorocromo es un indicador de los niveles intracelulares de ROS ya que al ser oxidada por especies reactivas de oxígeno se convierte en una molécula fluorescente. El anión hidroxilo es la principal especie capaz de oxidarlo. Por ello el DHR es un buen detector de este compuesto ³⁸.

La emisión de fluorescencia del DHR se analiza en el detector FL3. Se preparan suspensiones celulares con una densidad final de 2×10^5 células/mL en tampón PBS estéril y se añaden 2,5 μ L de una solución de 2 mg/mL de DHR en DMSO. Tras una incubación de 40 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, las muestras se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos se expresan como intensidad de fluorescencia generada por el DHR en el detector FL3.

3.8 Análisis del potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana de las mitocondrias de las células de *D. tertiolecta* expuestas a los diferentes tratamientos se analizó mediante citometría de flujo empleando el fluorocromo yoduro de 1,1',3,3'-Tetraetil-5,5',6,6'-tetracloroimidacarbocianina (JC1). Se trata de un compuesto procedente de la cianina que es capaz de unirse a las membranas mitocondriales cargadas; esta característica permite su uso para detectar si las membranas están o no polarizadas ya que es incapaz de unirse a una membrana despolarizada³⁹. Esta característica nos permite utilizar el JC1 para discriminar las células con las membranas mitocondriales despolarizadas (JC1-) y las polarizadas (JC1+)

La emisión de fluorescencia del JC1 se analiza en el detector FL3/FL1. Se preparan suspensiones celulares con una densidad final de 2×10^5 células/mL en tampón PBS estéril y se añaden 0,5 μ L de una solución de 0,5 mg/mL de JC1 en DMSO. Tras una incubación de 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, las muestras se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de células con las membranas mitocondriales polarizadas (JC1+) con respecto al total de células analizadas.

3.9 Análisis del pH intracelular

El pH de las células de *D. tertiolecta* expuestas a los diferentes tratamientos se analizó mediante citometría de flujo empleando un fluorocromo, el 2',7'-Bis-(2-Carboxietil)-5-(y-6)-Carboxifluoresceína (BCECF). Se trata de una especie que presenta fluorescencia dependiente del pH con un pKa de 7 por lo que se utiliza como indicador del pH intracelular⁴⁰. Gracias a esto podemos diferenciar células con pH inferiores a 7, consideradas células sin afectación, (BCECF-) y células afectadas, con pH superiores a 7 (BCECF+).

La emisión de fluorescencia del BCECF se analiza en el detector FL3/FL1. Se preparan suspensiones celulares con una densidad final de 2×10^5 células/mL en tampón PBS estéril y se añaden 1 μ L de una solución de 1 mg/mL de BCECF en DMSO. Tras una incubación de 40 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, las muestras se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de células sin afectación (BCECF-) con respecto al total de células analizadas.

3.10 Análisis del potencial de membrana citoplasmática

El potencial de membrana citoplasmática de las células de *D. tertiolecta* expuestas a los diferentes tratamientos se analizó mediante citometría de flujo empleando un fluorocromo altamente utilizado el bis-(1,3-ácido dibutilbarbitúrico) trimetino oxonol (DiBAC₄(3)). Se trata de un indicador aniónico, que penetra en la célula con mayor facilidad a través de membranas celulares relativamente

despolarizadas donde es retenida por unión a lípidos y proteínas intracelulares⁴¹. A diferencia del JC1, las células con la membrana citoplasmática polarizada se consideran DIBAC negativo (DIBAC-).

La emisión de fluorescencia del DIBAC se analiza en el detector FL1. Se preparan suspensiones celulares con una densidad final de 2×10^5 Células/mL en tampón PBS estéril y se añaden 1 μ L de una solución de 1 mg/mL de DIBAC en DMSO. Tras una incubación de 10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, las muestras se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de células con la membrana celular polarizada (DIBAC-) con respecto al total de células analizadas.

3.11 Análisis de la capacidad de biocaptación de OPRFs de *D. tertiolecta*

Se estudió la capacidad de biocaptación de *D. tertiolecta* mediante el procedimiento planteado en el diseño experimental, analizando la concentración de OPRFs en los medios de los cultivos tratados con la mezcla de los 5 contaminantes y de las muestras de seguimiento del contaminante en los que únicamente se añadió una cantidad final de 8 μ g/mL de la mezcla de contaminantes en agua marina en los mismos intervalos de tiempo. Para ello se centrifugan a 4000 rpm durante 5 minutos y filtran 20 mL de cada reactor para separar las microalgas del agua que se va a analizar y se guardan las muestras a 4°C durante 6-7 días. Los contaminantes se determinaron con mediante el uso de un método de microextracción en fase líquida asistida por vórtice (VALLME) con separación con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo con inyección con temperatura programada (PTV-GC-MS-MS) validado previamente en el TFG *Análisis de microcontaminantes emergentes en aguas* para el análisis de estos contaminantes. En el anexo se recogen las características físico-químicas de los OPRFs seleccionados en este estudio, Tablas 2 a 6.

3.12 Análisis estadístico

Para todos los parámetros estudiados, se han calculado media y desviación estándar de cada tratamiento. Para el tratamiento estadístico de los datos se ha utilizado el programa SPSS Static versión 26.0.0. En cada experiencia y para cada tiempo se realizó un ANOVA de una vía para comparar las respuestas de cada tratamiento. Además, posteriormente se ha realizado un test de Tukey para agrupar los diferentes cultivos en grupos sin diferencias significativas entre los tratamientos del mismo grupo. En todos los análisis se han considerado los resultados como significativos si $p < 0,05$.

Las gráficas se han realizado con el paquete estadístico y de gráficas avanzadas SigmaPlot (versión 14.0.)

3.13 Diseño experimental

Para el estudio global de los diferentes cultivos realizados se definieron 12 condiciones experimentales diferentes a los que se les ha asignado un código identificatorio. Estos códigos se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1 Códigos de los tratamientos utilizados

Tratamiento 1º Exp	Tratamiento 2º Exp	Tiempo (h)	Código
Control		3	C 3h
8 µg/mL		3	T ₈ 3h
Control		48	C 48h
8 µg/mL		48	T ₈ 48h
Control	Control	3	C' 3h
8 µg/mL	Control	3	CT ₈ 3h
Control	16 µg/mL	3	T ₁₆ 3h
8 µg/mL	16 µg/mL	3	T ₁₆ T ₈ 3h
Control	Control	48	C' 48h
8 µg/mL	Control	48	CT ₈ 48h
Control	16 µg/mL	48	T ₁₆ 48h
8 µg/mL	16 µg/mL	48	T ₁₆ T ₈ 48h

Para todas las experiencias, los cultivos se establecieron a partir de un inóculo en fase de crecimiento exponencial y se prepararon en botellas Pyrex de 500 mL conteniendo 150 mL de cultivo a una densidad inicial de 2×10^5 células/mL.

Para el estudio del efecto tóxico de una solución en DMSO (dimetilsulfóxido) de 5 OPRFs [(TiBP, Carbosynth (CAS: 126-71-6), TnBP, Sigma Aldrich (CAS: 126-73-8), TCPP, mixture isomers, Sigma Aldrich (CAS: 13674-84-5), TDCPP, Sigma Aldrich (CAS: 13674-87-8), TPPO, Sigma Aldrich (CAS: 791-28-6)] preparada a una relación constante entre concentraciones de 1:1:1:1:1, se realizó un ensayo previo para estudiar la potencial toxicidad del DMSO a una concentración de 0,02% (v/v) sobre el crecimiento microalgal, sin obtener diferencias significativas con respecto a los controles (datos no mostrados). En base a esto, todos los cultivos control utilizados en las diversas experiencias se prepararon con DMSO a la concentración final arriba referida.

En un primer bloque de ensayos, se prepararon cultivos control (C), sin contaminante, y cultivos tratados (T) con una concentración final entre la suma de los 5 compuestos de 8 µg/mL (EC₂₅, concentración de contaminante que produce una inhibición del 25% sobre el crecimiento de los cultivos, obtenida en estudios previos a las 48 horas de exposición mediante el programa CompuSyn) sometidos a las mismas condiciones de luz, temperatura, aireación y fotoperiodo que los cultivos de mantenimiento, además de muestras de seguimiento del contaminante en los que únicamente se añadió una cantidad final de 8 µg/mL de la mezcla de contaminantes en agua marina sin microalgas. A las 3 horas y 48 horas se retiraron 20 mL de las muestras de seguimiento del contaminante y de

los cultivos tratados (T) para estudiar la retirada de los OPRFs del medio; además se retiraron 10 mL de los cultivos control (C) y de los cultivos tratados (T) para estudiar los parámetros de toxicidad.

En un segundo bloque de ensayos, las microalgas que fueron expuestas previamente a 8 µg/mL de la mezcla de contaminantes fueron centrifugadas y se volvieron a exponer de nuevo a una concentración final de 16 µg/mL (EC_{50} concentración de contaminante que produce una inhibición del 50% sobre el crecimiento de los cultivos, calculado en estudios previos a las 48 horas mediante el programa CompuSyn) ajustando el volumen celular de nuevo a 2×10^5 células/mL (TT). En esta reexposición, se utilizaron como cultivos control los mismos cultivos utilizados como control en la primera exposición (C'), cultivos control de microalgas expuestas a contaminantes previamente (CT), cultivos que no fueron tratados en la primera exposición expuestos a 16 µg/mL (T) y muestra de seguimiento del contaminante que sólo presentan dicha concentración de la mezcla de contaminantes. Esta exposición, al igual que la anterior, se analizó a las 3 y 48 horas retirando 20 mL para estudiar la retirada de OPRFs y 10 mL para el estudio de la citotoxicidad. En anexos se encuentran las Figuras 9 y 10 explicativas del diseño experimental.

4. Resultados y discusión

4.1 Retirada de OPRFs

En primer lugar, se estudió la capacidad de retirada de estos OPRFs del medio de cultivo de *D. tertiolecta*. Para ello se comparó la cantidad de cada uno de estos contaminantes en cada muestra mediante el uso de la técnica de microextracción en fase líquida VALLME PTV-GC-MS-MS puesta a punto previamente en el TFG *Análisis de microcontaminantes emergentes en aguas*. Los resultados mostrados en la Figura 1 muestran la cantidad de OPRFs expresada en pg/célula retirados por las células microalgales, tal y como se describe en el apartado 3. Material y métodos con respecto a las muestras de seguimiento del contaminante.

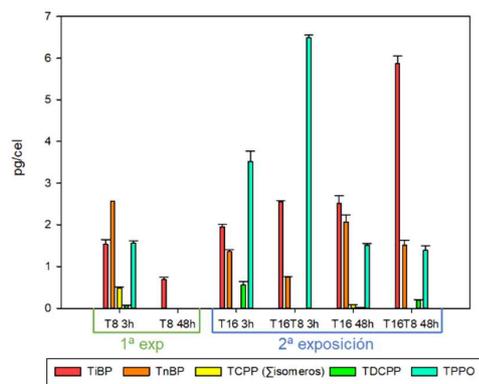


Figura 1 Datos de retirada de los 5 OPRFs por *D.tertiolecta*

En cuanto a la primera exposición, los resultados muestran que a las 3 horas de tratamiento a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la mezcla de 5 contaminantes se registra una retirada de todos ellos del medio de cultivo, mientras que, después de 48 horas, sólo el TiBP continúa siendo retirado. En la segunda exposición, en la que las células de *D. tertiolecta* se expusieron a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la mezcla de contaminantes, todos los OPRFs son retirados tanto a las 3 como a las 48 horas a excepción del TCPP que sólo se retira a las 48 horas. Esto podría deberse a que, al haber añadido mayor cantidad de contaminantes al cultivo, a las 48h todavía quedarían contaminantes en el medio disponibles para su retirada por *D. tertiolecta*, mientras que en la primera exposición, las microalgas habrían sido capaces de retirar la mayoría de los OPRFs a las 3 horas. Aun así, los resultados obtenidos en la primera exposición nos indicarían que la principal retirada de contaminantes se produce principalmente durante las primeras horas de exposición. En cuanto a la capacidad de retirada por parte de *D. tertiolecta*, no se observaron diferencias significativas entre las microalgas tratadas por primera vez (T_{16}) y las microalgas reexpuestas ($T_{16}T_8$).

No todos los contaminantes ensayados fueron retirados en la misma proporción del medio, siendo los compuestos clorados (TCPP y TDCPP) los que presentaron una menor retirada. En cambio, el TiBP y el TnBP, considerados biodegradables ⁹, fueron retirados por las microalgas de manera constante a lo largo del tiempo. De todos ellos, el TPPO, siendo el compuesto más voluminoso, es el que ha presentado los mayores valores de retirada a las 3 horas, si bien esta capacidad disminuye a lo largo del tiempo.

A conocimiento de los autores, este trabajo es el primero que aborda la retirada del medio de estos OPRFs, no solo específicamente utilizando microalgas, si no que no se ha estudiado con ningún organismo. Sin embargo, sí que se ha demostrado la capacidad de retirada de nanopartículas por parte de *D. tertiolecta*, siendo esta más importante en las primeras horas tras la exposición ⁴².

4.2 Efecto de los OPRFs sobre el crecimiento de los cultivos de *D. tertiolecta*

El crecimiento de los cultivos microalgales es un parámetro poblacional ampliamente utilizado para determinar la toxicidad de diferentes compuestos ⁴³ entre ellos el TBOEP ⁴⁴, un OPRFs no estudiado en este trabajo. El potencial efecto tóxico ejercido por la mezcla de contaminantes sobre el crecimiento de *D. tertiolecta* se estudió a partir de las tasas de crecimiento a las 3 y las 48 horas obtenidas para cada tratamiento. Los datos se muestran en la Figura 2.

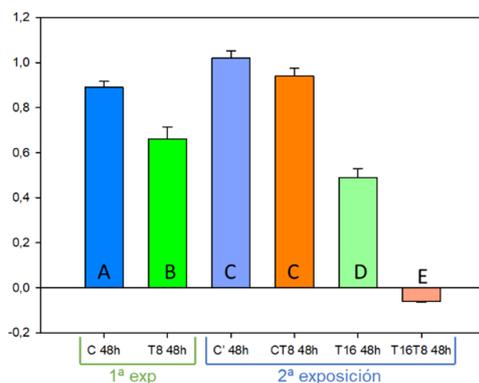


Figura 2 Datos de tasas de crecimiento expresadas en % de los cultivos. Cada letra indica grupos de cultivos iguales entre si y significativamente diferentes del resto.

En la primera exposición, se observaron diferencias significativas ($p=0,046$) entre el cultivo control (C 48h) y las microalgas tratadas (T₈ 48h), registrándose una reducción del crecimiento en el tratamiento de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del 25% (EC₂₅). En la segunda exposición, se observa que no hay diferencias significativas entre los dos cultivos control, las tratadas previamente (CT₈ 48h) y las no tratadas (C' 48h), pero sí entre los tratamientos de exposición a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (T₁₆ 48h y T₁₆T₈ 48h), ($p=0,018$) comportándose como EC₅₀ y EC₁₀₀ respectivamente ya que presentan

una inhibición del 50% en el caso del cultivo T₁₆ 48h y absoluta en el caso del cultivo celular reexpuesto (T₁₆T₈ 48h). Estos resultados indicarían que las microalgas sometidas a sucesivas exposiciones, en vez de adaptarse, se vuelven más vulnerables a estos contaminantes.

4.3 Efecto de los OPRFs sobre la viabilidad de los cultivos de *D. tertiolecta*

La viabilidad de las células se trata de un parámetro ampliamente utilizado en estudios de toxicidad en microalgas ²¹. En la Figura 3 se reflejan los resultados del porcentaje de células viables (PI-).

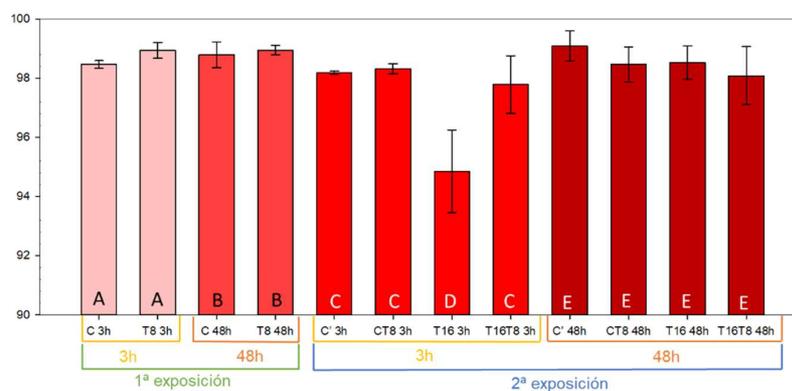


Figura 3 Datos de viabilidad obtenidos expresados en % de PI-. Cada letra indica grupos de cultivos iguales entre si y significativamente diferentes del resto.

En la primera exposición a la mezcla de contaminantes, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($p > 0,05$). En la segunda exposición, sólo se observó que el cultivo tratado a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (T₁₆ 3h) presenta diferencias significativas a las 3 horas con respecto al resto de tratamientos ($p = 0,022$). Esto indicaría que las microalgas que fueron expuestas previamente a la mezcla presentan una menor susceptibilidad al efecto tóxico de los OPRFs sobre la viabilidad, frente a las tratadas por primera vez, si bien éstas a las 48 horas ya se han recuperado. Esto coincide con lo visto en el estudio de retirada de los contaminantes ya que el momento de entrada parece ser a en las primeras horas como se ve en la Figura 1.

4.4 Efecto de los OPRFs sobre la vitalidad de los cultivos de *D. tertiolecta*

La vitalidad de las células es un parámetro utilizado en diversos estudios de toxicidad ²². En la Figura 4 se reflejan los resultados del porcentaje de células con nivel alto de vitalidad (FDA+).

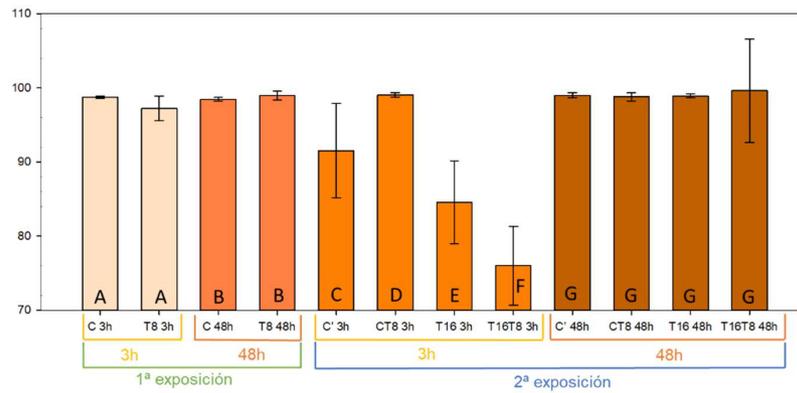


Figura 4 Datos de vitalidad expresados en % de FDA+. Cada letra indica grupos de cultivos iguales entre si y significativamente diferentes del resto.

De nuevo, en la primera exposición no se observaron diferencias significativas entre las células expuestas a la mezcla de 5 OPFRs y las células de los cultivos control. En la segunda exposición y de nuevo a las 3 horas, se observaron diferencias, siendo en este caso los 4 tratamientos significativamente diferentes ($p=0,025$). Observamos que las microalgas del cultivo tratadas de nuevo ($T_{16}T_8$ 3h) presentan una vitalidad menor que las del cultivo tratado (T_{16} 3h), pero a las 48 horas ya se han recuperado. Esto nos indica que las células son más sensibles a una segunda exposición ya que se encuentran más activas y, al igual que en anteriores análisis la afectación se produce tras la principal entrada de los 5 contaminantes registrada a las 3 horas.

4.5 Efecto de los OPFRs sobre los niveles intracelulares de ROS de los cultivos de *D. tertiolecta*

Los resultados de este estudio se reflejan en la Figura 5 mostrando la intensidad media de fluorescencia producida por el fluorocromo DHR en los diferentes tratamientos. Este parámetro está ampliamente extendido en estudios de citotoxicidad ²³.

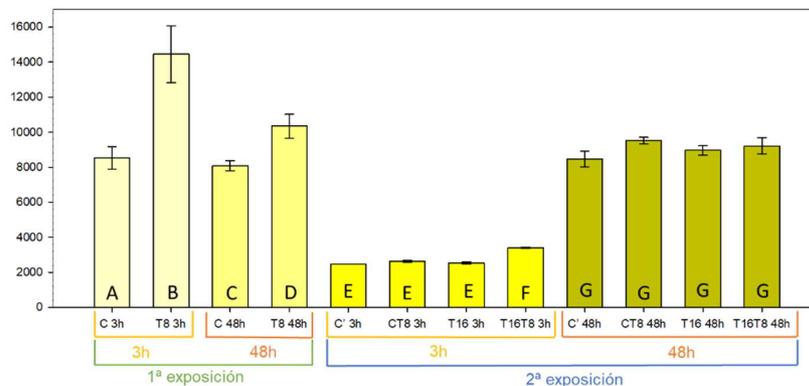


Figura 5 Datos de ROS expresados como intensidad producida por el DHR. Cada letra indica grupos de cultivos iguales entre si y significativamente diferentes del resto.

En la primera exposición se observan diferencias significativas entre los cultivos expuestos a 8 $\mu\text{g/mL}$ de mezcla de contaminantes y los cultivos control ($p=0,004$ a las 3h y $p=0,006$ a las 48h). El efecto es más acusado a las 3 horas dado que a las 48 horas se observa una suavización del mismo. En la segunda exposición sólo se observaron diferencias significativas ($p=0,001$) en el cultivo tratado de nuevo ($T_{16}T_8$ 3h). Ambas exposiciones nos indican que se produce un efecto tóxico a las 3 horas de la exposición y que progresivamente las células se van recuperando. De nuevo estos datos indicarían que las microalgas sufren una mayor afectación en las primeras horas de exposición, momento en que se registra la mayor retirada de la mezcla de contaminantes del medio, y que las previamente tratadas presentan alteraciones más severas que las que se exponen a los OPRs por primera vez.

4.6 Efecto de los OPRs sobre el potencial de membrana mitocondrial de los cultivos de *D.tertiolecta*

En la Figura 6 se muestran los resultados del porcentaje de células polarizadas marcadas con JC1 indicador del potencial de membrana mitocondrial (JC1+), utilizado como parámetro de estudio del efecto tóxico ²⁴.

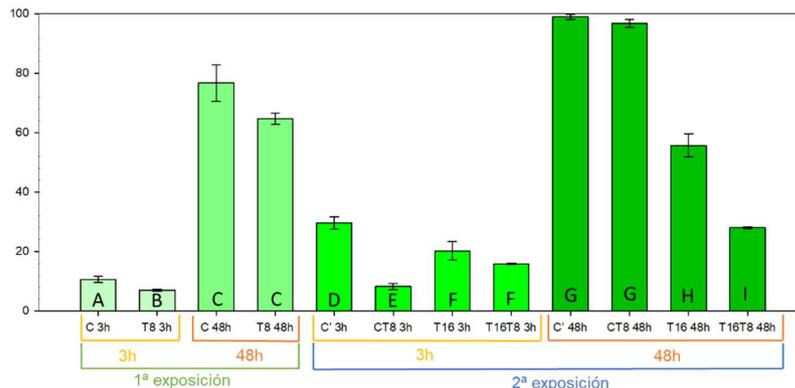


Figura 6 Datos del potencial de membrana mitocondrial expresados como % de JC1+. Cada letra indica grupos de cultivos iguales entre si y significativamente diferentes del resto.

Se observaron diferencias significativas entre el cultivo control (C 3h) y el cultivo tratado (T_8 3h) en la primera exposición a las 3 horas ($p=0,017$), pero no a las 48 horas. En la segunda exposición, a las 3 horas la respuesta de ambos cultivos tratados (T_{16} 3h y $T_{16}T_8$ 3h) fue diferente de los controles, pero cada control se corresponde con un grupo propio diferenciado del resto ($p=0,001$). Sin embargo, a las 48 horas ambos cultivos tratados (T_{16} 48h y $T_{16}T_8$ 48h) presentan respuestas diferentes entre ellos y con los cultivos control ($p=0,026$), entre los cuales no hubo diferencias. Los datos sugerirían la hipótesis ya planteada para

los resultados de los niveles intracelulares de ROS, de modo que la afectación se produce a las 3 horas y luego las células se recuperan. Además, en la segunda exposición, las células previamente expuestas a los contaminantes (T₁₆T₈ 48h) presentan una recuperación menor al ser expuestas de nuevo a la mezcla.

4.7 Efecto de los OPRFs sobre el pH intracelular de los cultivos de *D.tertiolecta*

Para el estudio del pH intracelular de las células se analizaron los diferentes controles y tratamientos. En la Figura 7 se reflejan los resultados del porcentaje de células de una población que presentan un valor de pH intracelular en torno a 7 y por tanto no están afectadas (BCECF-). El BCECF es un fluorocromo utilizado en estudios de citotoxicidad ²⁵.

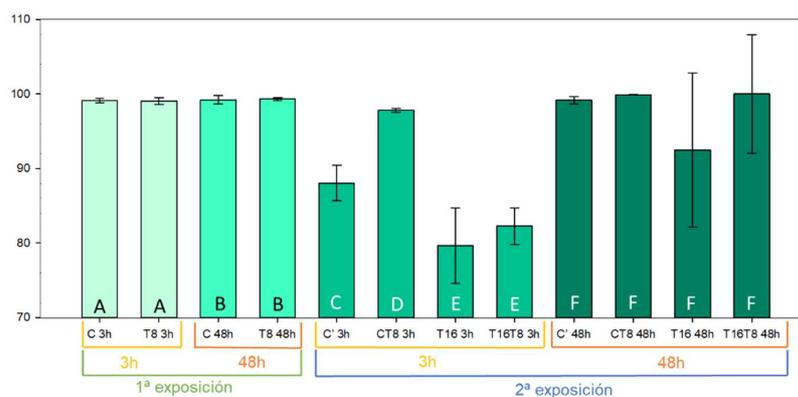


Figura 7 Datos de pH expresados en % de BCECF-. Cada letra indica grupos de cultivos iguales entre si y significativamente diferentes del resto.

En la primera exposición todos los tratamientos presentan un comportamiento similar, sin que se observen diferencias significativas entre los mismos. En la segunda exposición sólo se detectaron diferencias significativas a las 3 horas entre los cultivos control (C' 3h y CT₈ 3h) y los tratados (T₁₆ 3h y T₁₆T₈ 3h) formando dos grupos diferentes (p=0,01). También se observa que tras esta primera respuesta las células son capaces de recuperarse a las 48 horas, reafirmando la hipótesis de mayor retirada y afectación de los contaminantes en las primeras horas de exposición.

4.8 Efecto de los OPRFs sobre el potencial de membrana citoplasmática de los cultivos de *D.tertiolecta*

Para el estudio del potencial de membrana citoplasmática de las células, utilizado para determinar la toxicidad de diferentes compuestos ²⁶, se analizaron los 12 tratamientos. En la Figura 8 se reflejan los resultados del porcentaje de células con las membranas citoplasmáticas polarizadas (DIBAC-).

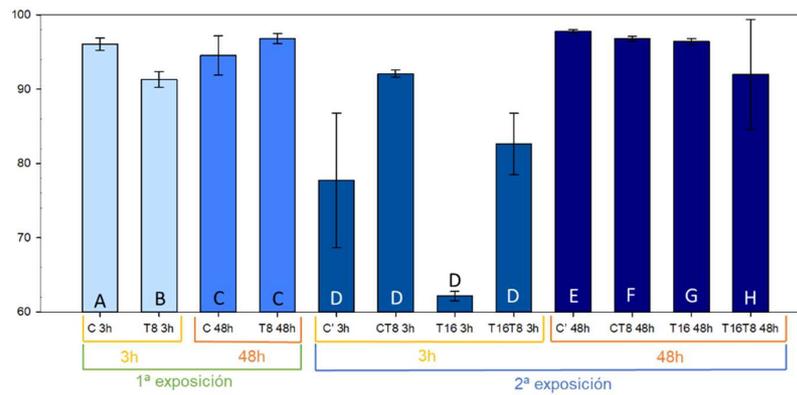


Figura 8 Datos de potencial de membrana citoplasmática expresados como % de DIBAC-. Cada letra indica grupos de cultivos iguales entre si y significativamente diferentes del resto.

En este caso en la primera exposición se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos C 3h y T₈ 3h ($p=0,04$), pero no entre C 48h y T₈ 48h lo cual reafirma la hipótesis de que la afectación ocurre durante las primeras horas. En la segunda exposición a las 3 horas no se detectaron diferencias significativas, probablemente debido a la variación de los datos. A las 48 horas cada tratamiento presenta diferencias significativas con el resto de cultivos ($p=0,001$).

Resumiendo, al comparar todas las medidas realizadas mediante citometría de flujo podemos observar que, en la mayoría de ellas, la mayor afectación se produce a las 3 horas, y que además, en la mayoría de casos, *D. tertiolecta* recupera valores similares a los observados en los cultivos no expuestos a las 48 horas. Sin embargo, esto no se registra en todos los parámetros estudiados, lo que corrobora los datos de crecimiento ya que parece que, aunque haya una cierta recuperación de estos microorganismos, son más sensibles a una segunda exposición ya que no son capaces de recuperarse del todo tras la primera exposición, tal y como se observa en los datos de ROS y vitalidad. Estos resultados contrastan con otros estudios en los que en la segunda exposición de *Chlorella pyrenoidosa* y *Microcystis aeruginosa* se detectó una menor afectación frente al antibiótico clortetraciclina¹⁹. Esto se confirma con los datos obtenidos de la capacidad de biocaptación de la microalga, ya que también se observa una mayor retirada de la mezcla de contaminantes a las 3 horas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo abalan la necesidad de realizar ensayos de toxicidad con mezclas heterogéneas de contaminantes tal y como se hayan en el medio natural. Del mismo modo los ensayos realizados de exposición y reexposición sucesiva de *D. tertiolecta* a los contaminantes también aportan valiosa información sobre los potenciales efectos tóxicos que pueden sufrir los organismos en los medios acuáticos cuando se ven sometidos a descargas repetidas de contaminantes fenómenos particularmente habituales en aguas costeras cercanas a núcleos urbanos o industriales.

5. Conclusiones

1. La exposición a la mezcla de 5 OPRFs (TiBP, TnBP, TCPP (Σisómeros), TDCPP y TPPO) provoca citotoxicidad sobre la microalga *D. tertiolecta*, afectando significativamente a todos los biomarcadores ensayados (viabilidad, vitalidad, niveles intracelulares de ROS, potencial de membrana mitocondrial, pH intracelular y potencial de membrana citoplasmática), siendo el análisis de los niveles intracelulares de ROS el más afectado.
2. La retirada de los compuestos del medio de cultivo de *D. tertiolecta* se observa ya a las 3 horas de la exposición a la mezcla de contaminantes, siendo los clorados (TCPP y TDCPP) los que presentan una menor retirada.
3. Una segunda exposición a la mezcla de contaminantes produce una toxicidad más severa en las células microalgales reexpuestas en comparación con las alteraciones registradas en las microalgas expuestas por primera vez.

5. Conclusións

1. A exposición á mestura de 5 OPRFs (TiBP, TnBP, TCPP (Σ isómeros), TDCPP e TPPO) provoca citotoxicidade sobre a microalga *D. tertiolecta*, afectando significativamente a todos os biomarcadores ensaiados (viabilidade, vitalidade, niveis intracelulares de ROS, potencial de membrana mitocondrial, pH intracelular e potencial de membrana citoplasmática), sendo o análise dos niveis intracelulares de ROS o máis afectado.
2. A retirada dos compostos do medio de cultivo de *D. tertiolecta* observase xa ás 3 horas da exposición á mestura de contaminantes, sendo os clorados (TCPP e TDCPP) os que presentan unha menor retirada.
3. Unha segunda exposición á mestura de contaminantes produce unha toxicidade máis severa nas células microalgais reexpuestas en comparación coas alteracións rexistradas nas microalgas expostas por primeira vez.

5. Conclusions

1. Exposure to the mixture of 5 OPRFs (TiBP, TnBP, TCPP (Σ isomers), TDCPP and TPPO) causes cytotoxicity on the microalga *D. tertiolecta*, significantly affecting all biomarkers tested (viability, vitality, intracellular ROS levels, mitochondrial membrane potential, intracellular pH and cytoplasmic membrane potential), with the analysis of intracellular ROS levels being the most affected.
2. The removal of compounds from the culture medium of *D. tertiolecta* is observed as early as 3 hours after exposure to the contaminant mixture, with chlorinated compounds (TCPP and TDCPP) showing the least removal.
3. A second exposure to the contaminant mixture produces a more severe toxicity in the re-exposed microalgal cells compared to the alterations recorded in the microalgae exposed for the first time.

6. Bibliografía

1. Akhbarizadeh, R., Dobaradaran, S., Schmidt, T. C., Nabipour, I. & Spitz, J. Worldwide bottled water occurrence of emerging contaminants: A review of the recent scientific literature. *J. Hazard. Mater.* **392**, 122271 (2020).
2. Galindo-Miranda, J. M. *et al.* Occurrence of emerging contaminants in environmental surface waters and their analytical methodology - A review. *Water Sci. Technol. Water Supply* **19**, 1871–1884 (2019).
3. Suhrhoff, T. J. & Scholz-Böttcher, B. M. Qualitative impact of salinity, UV radiation and turbulence on leaching of organic plastic additives from four common plastics - A lab experiment. *Mar. Pollut. Bull.* **102**, 84–94 (2016).
4. WaterJPI. Water challenges for a changing world. http://www.waterjpi.eu/resources/document-library/waterjpi_policy_brief_final.pdf/view (2018).
5. van der Veen, I. & de Boer, J. Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis. *Chemosphere* **88**, 1119–1153 (2012).
6. Chen, L. & Wang, Y. Z. A review on flame retardant technology in China. Part I: Development of flame retardants. *Polym. Adv. Technol.* **21**, 1–26 (2010).
7. Laoutid, F., Bonnaud, L., Alexandre, M., Lopez-Cuesta, J. M. & Dubois, P. New prospects in flame retardant polymer materials: From fundamentals to nanocomposites. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **63**, 100–125 (2009).
8. Anastas, P. & Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 301–312 (2010).
9. Verbruggen, E. M. J., Rila, J. P., Traas, T. P., Posthuma-Doodeman, C. & Posthumus, R. Environmental Risk Limits for several phosphate esters, with possible application as flame retardant. 118 (2006).
10. Sigma-Aldrich. Sigma Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/ES/en> (2021).
11. Beach, M. W. *et al.* Studies of degradation enhancement of polystyrene by flame retardant additives. *Polym. Degrad. Stab.* **93**, 1664–1673 (2008).
12. Emery, R. J., Papadaki, M., Freitas Dos Santos, L. M. & Mantzavinos, D. Extent of sonochemical degradation and change of toxicity of a pharmaceutical precursor (triphenylphosphine oxide) in water as a function of treatment conditions. *Environ. Int.* **31**, 207–211 (2005).
13. Hermabessiere, L. *et al.* Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review. *Chemosphere* **182**, 781–793 (2017).
14. Zhang, L. *et al.* Organophosphorus flame retardants (OPFRs) in the seawater and sediments of the Qinzhou Bay, Northern Beibu Gulf: Occurrence, distribution, and ecological risks. *Mar. Pollut. Bull.* **168**, (2021).
15. Nikookar, K., Moradshahi, A. & Hosseini, L. Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity. *Biomol. Eng.* **22**, 141–146 (2005).
16. DeLorenzo, M. E. & Serrano, L. Individual and mixture toxicity of Three

- pesticides; atrazine, chlorpyrifos, and chlorothalonil to the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* **38**, 529–538 (2003).
17. Manzo, S., Miglietta, M. L., Rametta, G., Buono, S. & Di Francia, G. Toxic effects of ZnO nanoparticles towards marine algae *Dunaliella tertiolecta*. *Sci. Total Environ.* **445–446**, 371–376 (2013).
 18. Bergami, E. *et al.* Long-term toxicity of surface-charged polystyrene nanoplastics to marine planktonic species *Dunaliella tertiolecta* and *Artemia franciscana*. *Aquat. Toxicol.* **189**, 159–169 (2017).
 19. Lu, L., Wu, Y., Ding, H. & Zhang, W. The combined and second exposure effect of copper (II) and chlortetracycline on fresh water algae, *Chlorella pyrenoidosa* and *Microcystis aeruginosa*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **40**, 140–148 (2015).
 20. Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C. & Boulanger, C. M. Flow cytometry: Retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* **64**, 109–130 (2012).
 21. An, S. A. *et al.* Identification of potential toxicants in sediments from an industrialized area in Pohang, South Korea: Application of a cell viability assay of microalgae using flow cytometry. *J. Hazard. Mater.* **405**, 124230 (2021).
 22. Míguez, L., Esperanza, M., Seoane, M. & Cid, Á. Assessment of cytotoxicity biomarkers on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to emerging and priority pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **208**, (2021).
 23. Liu, Q. *et al.* Toxic effect and mechanism of tris (1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP) on the marine alga *Phaeodactylum tricornutum*. *Chemosphere* **252**, 126467 (2020).
 24. Ye, N., Wang, Z., Wang, S., Fang, H. & Wang, D. Dissolved organic matter and aluminum oxide nanoparticles synergistically cause cellular responses in freshwater microalgae. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* **53**, 651–658 (2018).
 25. Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C. & Cid, Á. Differential toxicity of the UV-filters BP-3 and BP-4 in *Chlamydomonas reinhardtii*: A flow cytometric approach. *Sci. Total Environ.* **669**, 412–420 (2019).
 26. Esperanza, M., Seoane, M., Servia, M. J. & Cid, Á. Effects of Bisphenol A on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* and the clam *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **197**, (2020).
 27. Franqueira, D., Orosa, M., Torres, E., Herrero, C. & Cid, A. Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. *Sci. Total Environ.* **247**, 119–126 (2000).
 28. McBee, M. E. *et al.* Production of superoxide in bacteria is stress- and cell state-dependent: A gating-optimized flow cytometry method that minimizes ROS measurement artifacts with fluorescent dyes. *Front. Microbiol.* **8**, 1–17 (2017).
 29. Seoane, M., Esperanza, M., Rioboo, C., Herrero, C. & Cid, Á. Flow cytometric assay to assess short-term effects of personal care products on the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Chemosphere* **171**, 339–347 (2017).
 30. Sivandzade, F., Bhalerao, A. & Cucullo, L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent

- Probe. *Bio-Protocol* **9**, 1–13 (2019).
31. Franklin, N. M., Adams, M. S., Stauber, J. L. & Lim, R. P. Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **40**, 469–480 (2001).
 32. Lima, S. *et al.* Autochthonous microalgae grown in municipal wastewaters as a tool for effectively removing nitrogen and phosphorous. *J. Water Process Eng.* **38**, 101647 (2020).
 33. Shahid, A. *et al.* Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation; a review. *Sci. Total Environ.* **704**, 135303 (2020).
 34. Santaefemia, S., Abalde, J. & Torres, E. Eco-friendly rapid removal of triclosan from seawater using biomass of a microalgal species: Kinetic and equilibrium studies. *J. Hazard. Mater.* **369**, 674–683 (2019).
 35. Polle, J. E. W., Jin, E. S. & Ben-Amotz, A. The alga *Dunaliella* revisited: Looking back and moving forward with model and production organisms. *Algal Res.* **49**, 101948 (2020).
 36. R.W. Butcher. An Introductory Account of the Smaller Algae of British Coastal Waters. in (ed. Food, M. of A. F. and) 90 (1959).
 37. Geary, S., Ganf, G. & Brookes, J. The use of FDA and flow cytometry to measure the metabolic activity of the cyanobacteria, *Microcystis aeruginosa*. *SIL Proceedings, 1922-2010* **26**, 2367–2369 (1998).
 38. Cortizo, A. M., Bruzzone, L., Molinuevo, S. & Etcheverry, S. B. A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines. *Toxicology* **147**, 89–99 (2000).
 39. Perelman, A. *et al.* JC-1: Alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis.* **3**, 1–7 (2012).
 40. Kolber, M. A., Quinones, R. R., Gress, R. E. & Henkert, P. A. Measurement of cytotoxicity by target cell release and retention of the fluorescent dye bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF). *J. Immunol. Methods* **108**, 255–264 (1988).
 41. Klapperstück, T., Glanz, D., Klapperstück, M. & Wohlrab, J. Methodological aspects of measuring absolute values of membrane potential in human cells by flow cytometry. *Cytom. Part A* **75**, 593–608 (2009).
 42. Morelli, E. *et al.* TiO₂ nanoparticles in seawater: Aggregation and interactions with the green alga *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **148**, 184–193 (2018).
 43. Van Wezel, A. P. & Van Vlaardingen, P. Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquat. Toxicol.* **66**, 427–444 (2004).
 44. Giraud, M., Douville, M. & Houde, M. Chronic toxicity evaluation of the flame retardant tris (2-butoxyethyl) phosphate (TBOEP) using *Daphnia magna* transcriptomic response. *Chemosphere* **132**, 159–165 (2015).

Anexos

Tabla 2 Características físico-químicas del TiBP

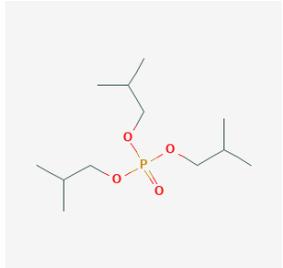
Abreviatura	TiBP
Nombre completo	Tri-iso-butyl phosphate
CAS	126-71-6
Kow	3.60
Formulación	C ₁₂ H ₂₇ O ₄ P
Solubilidad en agua	0,26 g/L
Tª ebullición	264 °C
Estructura	

Tabla 3 Características físico-químicas del TnBP

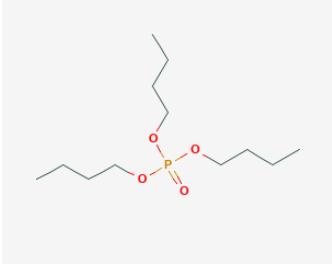
Abreviatura	TnBP
Nombre completo	Tri-n-butyl phosphate
CAS	126-73-8
Kow	4.00
Formulación	C ₁₂ H ₂₇ O ₄ P
Solubilidad en agua	0,28 g/L
Tª ebullición	289 °C
Estructura	

Tabla 4 Características físico-químicas del TCPP (Σisomeros)

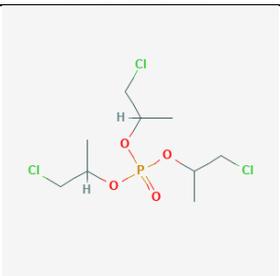
Abreviatura	TCPP (Σisomeros)
Nombre completo	Tris(chloropropyl)phosphate
CAS	13674-84-5
Kow	2.59
Formulación	C ₉ H ₁₈ Cl ₃ O ₄ P
Solubilidad en agua	1,6 g/L
T ^a ebullición	218-220 °C
Estructura	

Tabla 5 Características físico-químicas del TDCPP

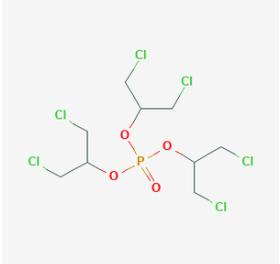
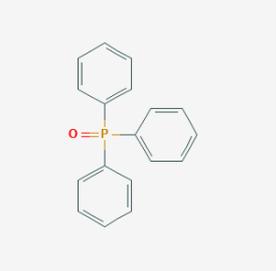
Abreviatura	TDCPP
Nombre completo	1,3-Dichloro-2propanol phosphate
CAS	13674-87-8
Kow	3.65
Formulación	C ₉ H ₁₅ Cl ₆ O ₄ P
Solubilidad en agua	7 mg/L
T ^a ebullición	236 °C
Estructura	

Tabla 6 Características físico-químicas del TPPO

Abreviatura	TPPO
Nombre completo	Triphenylphosphine oxide
CAS	791-28-6
Kow	2.83
Formulación	C ₁₈ H ₁₅ OP
Solubilidad en agua	Insoluble
T ^a ebullición	360 °C
Estructura	

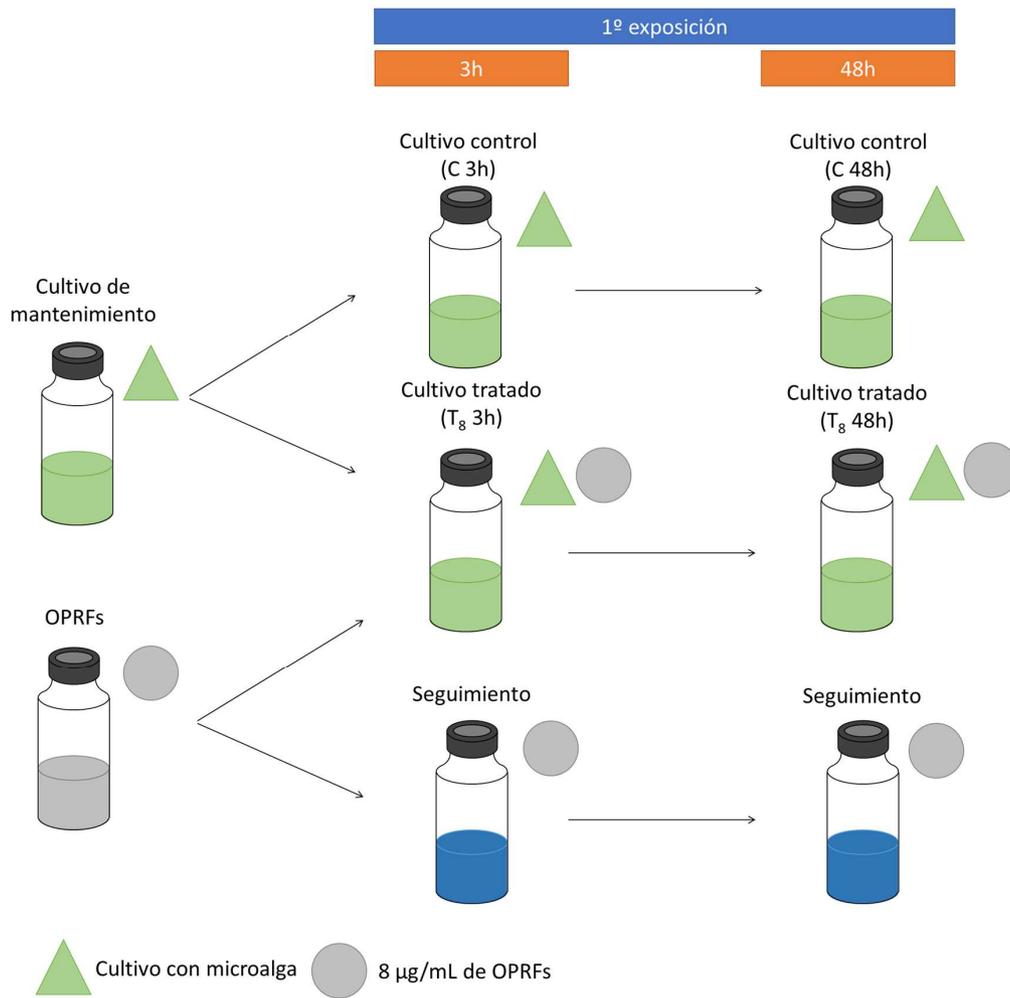


Figura 9 Esquema del diseño experimental de la primera exposición

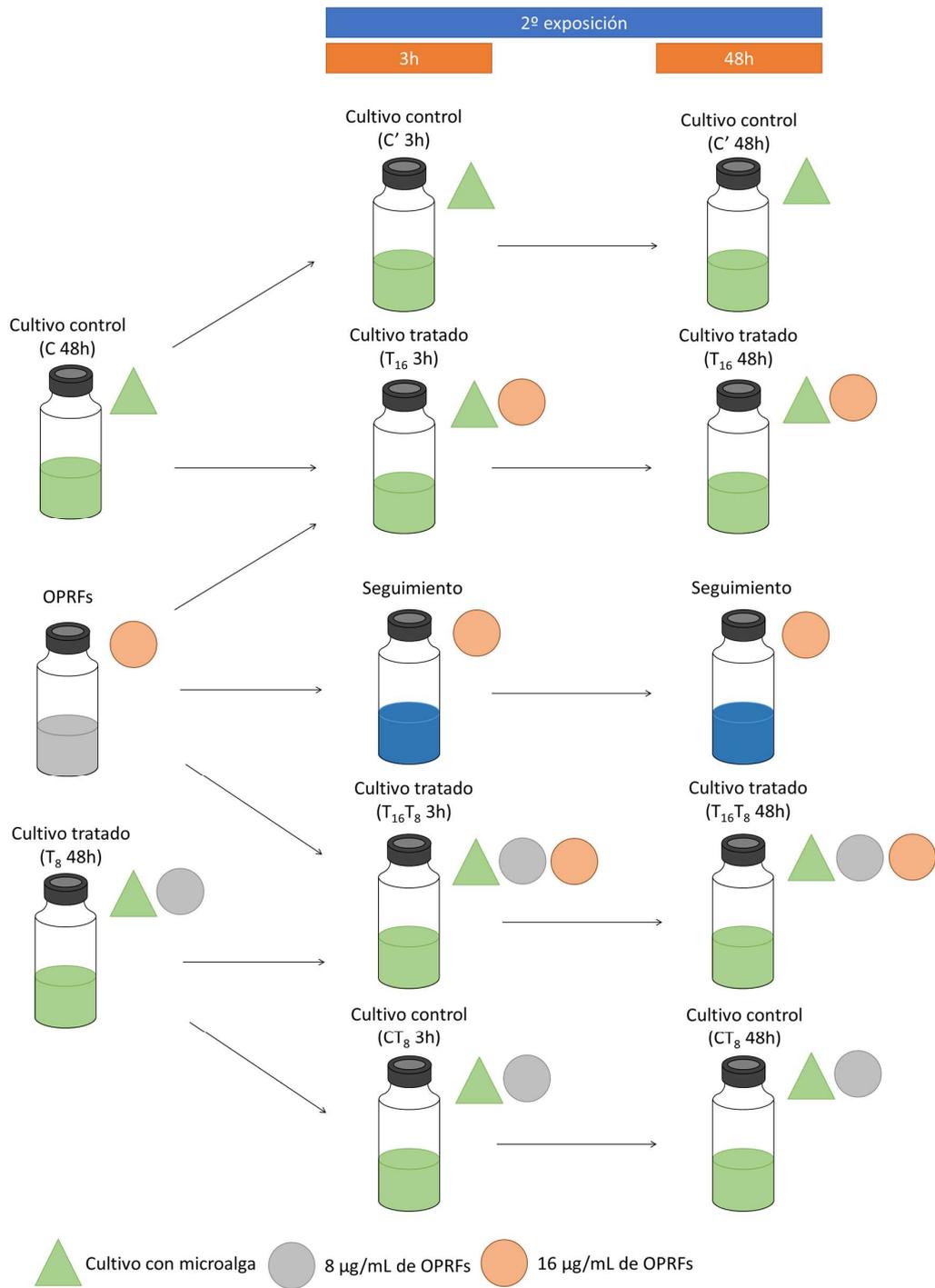


Figura 10 Esquema del diseño experimental de la segunda exposición