



UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

Facultad de Ciencias

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Toxicidad de contaminantes emergentes farmacéuticos sobre la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii*

Toxicidade de contaminantes emerxentes farmacéuticos sobre a microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii*

Pharmaceutical emergent pollutants toxicity on the model microalga *Chlamydomonas reinhardtii*

Elena Fernández González

Curso: 2022 - 2023. Convocatoria: Junio

Directora 1: Ángeles Cid Blanco

Directora 2: Carmen Rioboo Blanco

Índice

1. Resumen	3
2. Índice de abreviaturas.....	5
3. Introducción.....	6
4. Objetivos	7
5. Material y métodos	7
5.1. Descripción de la especie	7
5.2. Cultivo microalgal.....	8
5.3. Contaminantes: Azitromicina e Hidroxicloroquina.....	9
5.4. Preparación de las soluciones <i>stock</i> de los contaminantes	11
5.5. Análisis mediante citometría de flujo (CMF)	11
5.5.1. Determinación de la densidad celular	12
5.5.2. Determinación de las tasas de crecimiento	12
5.5.3. Análisis de la viabilidad celular	12
5.6. Análisis de la actividad fotosintética mediante fluorometría de la modulación de amplitud de pulso (PAM).....	13
5.7. Cálculo de la concentración efectiva media (EC ₅₀).....	14
5.8. Diseño experimental.....	14
5.9. Análisis estadístico	15
6. Resultados y discusión	16
6.1. Efectos de los contaminantes sobre el crecimiento microalgal.....	16
6.2. Efectos de los contaminantes sobre la viabilidad celular.....	18
6.3. Efectos de los contaminantes sobre la actividad fotosintética	20
7. Conclusiones	23
8. Bibliografía.....	25
9. Anexo I	31
9.1. Composición del medio GOLDMEDIUM-FWS:	31

1. Resumen

Los contaminantes emergentes son sustancias potencialmente dañinas para los seres vivos y el medio ambiente. Actualmente, son compuestos detectados con frecuencia en los ecosistemas acuáticos, suponiendo una gran amenaza para la biodiversidad asociada. En este trabajo se estudia la toxicidad ejercida por dos fármacos considerados contaminantes emergentes, la azitromicina y la hidroxiclороquina, sobre *Chlamydomonas reinhardtii*, una especie de microalga de agua dulce. Para ello, se expone a la microalga a concentraciones crecientes de cada uno de los contaminantes de forma individual. Los resultados revelan que la azitromicina inhibe el crecimiento microalgal incluso a las concentraciones más bajas ensayadas (0,5-2,5 mg l⁻¹). En cambio, fueron necesarias concentraciones más elevadas de hidroxiclороquina para observar afectación en este parámetro. Esto se refleja en los valores de concentración efectiva media (EC₅₀) obtenidos a las 72 horas de exposición a sendos antimicrobianos, siendo la EC₅₀ para la azitromicina de 0,80 mg l⁻¹ y la EC₅₀ para la hidroxiclороquina de 19,43 mg l⁻¹. En cuanto al análisis de la viabilidad celular y la tasa de fotosíntesis, bajas concentraciones de azitromicina provocan alteraciones en la actividad fotosintética de *C. reinhardtii*, mientras que la hidroxiclороquina, en las concentraciones testadas (10-30 mg l⁻¹), disminuye la viabilidad celular. Futuros ensayos en donde se evaluaran los efectos combinados de ambos contaminantes ayudarían a ampliar el conocimiento sobre su modo de acción en los ambientes naturales.

Palabras clave: *Chlamydomonas reinhardtii*, microalga, contaminantes emergentes, azitromicina, hidroxiclороquina, toxicidad.

Resumo

Os contaminantes emerxentes son sustancias potencialmente prexudiciais para os seres vivos e o medio ambiente. Actualmente, son compostos detectados con frecuencia nos ecosistemas acuáticos, supoñendo unha gran ameaza para a biodiversidade asociada. Neste traballo se estuda a toxicidade exercida por dous fármacos considerados contaminantes emerxentes, a azitromicina e a hidroxiclороquina, sobre *Chlamydomonas reinhardtii*, unha especie de microalga de auga doce. Para iso, expónse a microalga a concentracións crecentes de cada un dos contaminantes de forma individual. Os resultados revelan que a azitromicina inhibe o crecemento microalgal incluso as concentracións máis baixas ensaiadas (0,5-2,5 mg l⁻¹). En cambio, foron necesarias concentracións

máis elevadas de hidroxiclороquina para observar afectación neste parámetro. Isto refléxase nos valores de concentración efectiva media (EC₅₀) obtidos as 72 h de exposición a sendos antimicrobianos, sendo a EC₅₀ para a azitromicina de 0,80 mg l⁻¹ e a EC₅₀ para a hidroxiclороquina de 19,43 mg l⁻¹. En canto a análise da viabilidade celular e a taxa de fotosíntese, baixas concentracións de azitromicina provocan alteracións na actividade fotosintética de *C. reinhardtii*, mentres que a hidroxiclороquina, nas concentracións testadas (10-30 mg l⁻¹), diminúe a viabilidade celular. Futuros ensaios onde se avaliasen os efectos combinados de ambos contaminantes axudarían a ampliar o coñecemento sobre o seu modo de acción nos ambientes naturais.

Palabras chave: *Chlamydomonas reinhardtii*, microalga, contaminantes emerxentes, azitromicina, hidroxiclороquina, toxicidade.

Abstract

Emerging pollutants are substances potentially harmful to living organism and the environment. Currently, they are compounds frequently detected in aquatic ecosystems, posing a great threat to the associated biodiversity. This work studies the toxicity exerted by two drugs considered emerging pollutants, azithromycin and hydroxychloroquine, on *Chlamydomonas reinhardtii*, a freshwater microalgae species. To do this, the microalgae is exposed to increasing concentrations of each of the pollutants individually. The results show that azithromycin inhibits microalgal growth even at the lowest concentrations tested (0.5-2.5 mg l⁻¹). Instead, higher concentrations of hydroxychloroquine were necessary to observe involvement on this parameter. This is reflected in the half maximal effective concentration values (EC₅₀) obtained after 72 hours of exposure to both antimicrobials, being the EC₅₀ for azithromycin 0.80 mg l⁻¹ and being the EC₅₀ for hydroxychloroquine 19.43 mg l⁻¹. As for the analysis of cell viability and the photosynthetic rate, low azithromycin concentrations cause alterations in the photosynthetic activity of *C. reinhardtii*, while hydroxychloroquine, at the tested concentrations (10-30 mg l⁻¹) decreases cell viability. Future trials evaluating the combined effects of both pollutants would help to increase the knowledge about their action mode in natural environments.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, microalga, emerging pollutants, azithromycin, hydroxychloroquine, toxicity.

2. Índice de abreviaturas

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> , Análisis de la Varianza
AZT	Azitromicina
CCAP	<i>Culture Collection of Algae and Protozoa</i> , Colección de Cultivos de Algas y Protozoos
CEs	Contaminantes emergentes
EC ₅₀	<i>Half maximal Effective Concentration</i> , Concentración efectiva media.
CMF	Citometría de flujo
FSC	<i>Forward Scatter Channel</i> , Canal de dispersión frontal
H ₀	Hipótesis nula
HCQ	Hidroxicloroquina
IP	Ioduro de propidio
PAM	<i>Pulse Amplitude Modulation</i> , Fluorometría de modulación de amplitud de pulso
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Tampón fosfato salino
PSI	<i>Photosystem I</i> , Fotosistema I
PSII	<i>Photosystem II</i> , Fotosistema II
QY	<i>Quantum Yield</i> , Eficiencia fotosintética
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , Especies Reactivas de Oxígeno
SSC	<i>Side Scatter Channel</i> , Canal de dispersión lateral
U.A.	Unidades Arbitrarias

3. Introducción

En las últimas décadas, la industrialización, el desarrollo tecnológico y el incremento progresivo de la población están provocando una mayor detección en los ecosistemas acuáticos de sustancias potencialmente causantes de efectos nocivos en los seres vivos y el medio ambiente. Estos compuestos, conocidos como contaminantes emergentes (CEs), son de distinto origen y naturaleza química, encontrándose dentro de este grupo productos farmacéuticos, plaguicidas, cosméticos, productos de limpieza y productos de higiene personal, entre otros (Reinoso Carrasco et al., 2017).

El consumo y uso de estas sustancias está aumentando progresivamente, lo que conlleva impactos sanitarios, económicos, ecológicos y sociales (Puri et al., 2023; Naskar et al., 2022). Las actividades humanas, como la industrial, la agricultura y ganadería intensivas y el consumo humano, junto a su difícil degradación en las plantas de tratamiento de aguas residuales, están provocando que los CEs lleguen a los ambientes acuáticos (Reinoso Carrasco et al., 2017).

Su presencia en dichos ambientes promueve la pérdida de hábitats y de la biodiversidad asociada (Varó Galvañ et al., 2016). La mayoría de estos compuestos son disruptores endocrinos (Ministerio Para la Transición Ecológica y El Reto Demográfico, s.f.), pudiendo ejercer además otros tipos de efectos tóxicos agudos o crónicos.

Incluso en las bajas concentraciones en las que son detectados, desde $\mu\text{g l}^{-1}$ a ng l^{-1} y en raras ocasiones en mg l^{-1} (Dalu & Tavengwa, 2022; Nie et al., 2013), son capaces de provocar efectos adversos en los organismos no diana (Moro et al., 2014).

En cuanto a la regulación de los CEs, la Comisión Europea aprueba cada dos años la “Lista de Sustancias Prioritarias”. Se trata de una relación reducida de CEs, según su peligrosidad y que está basada en la “Lista de Observación” (creada en 2013), que incluye algunos de los contaminantes emergentes que se detectan en alguno de los 36 puntos de muestreo situados a lo largo de la geografía española. Pese a todo, gran cantidad de los CEs no están sometidos a una regulación que limite su presencia en el agua (Ministerio Para la Transición Ecológica y El Reto Demográfico, s. f.).

Las microalgas son microorganismos no diana muy utilizados en la detección de contaminantes en aguas y en estudios de toxicidad *in vitro* (Esperanza et al., 2019). Constituyen la base de la red trófica acuática lo que provoca que cualquier

alteración que les afecte, pueda causar efectos de mayor magnitud en otros organismos situados en niveles tróficos superiores (Nie et al., 2013).

Las microalgas que habitan dichos ambientes acuáticos son unos excelentes bioindicadores de los cambios ambientales espaciales y temporales. Gracias a su ciclo de vida corto y a su rápido crecimiento, permiten evaluar y predecir cambios medioambientales a corto plazo. En consecuencia, nos proporcionan información sobre la calidad química del agua para ayudar en la toma de las medidas necesarias para proteger el ecosistema (Omar, 2010).

Dentro de los CEs, destaca en los últimos años la preocupación por la presencia de fármacos en los medios acuáticos. Los fármacos no son absorbidos en su totalidad por el cuerpo humano, siendo excretados a través de la orina y las heces lo que provoca su llegada a dichos sistemas acuáticos a través de las aguas residuales (Moro et al., 2014).

Este trabajo se centra en dos compuestos farmacéuticos ampliamente distribuidos y frecuentemente detectados en las aguas dulces, la azitromicina (antibiótico) y la hidroxiclороquina (antimalárico) (Mao et al., 2021; Gümüş & Gümüş, 2022). El incremento exponencial durante las últimas décadas del consumo de antibióticos (Mao et al., 2021) y otros medicamentos (Guindon et al., 2022), junto a su potencial efecto perjudicial en organismos no diana, unido a la elevada sensibilidad frente a los cambios ambientales de las microalgas, hacen de vital importancia conocer los potenciales mecanismos de toxicidad de estos contaminantes sobre dichos microorganismos fotosintéticos para poder evaluar correctamente los riesgos medioambientales (Mao et al., 2021).

4. Objetivos

La finalidad de este trabajo es evaluar el potencial efecto tóxico de dos contaminantes emergentes, azitromicina e hidroxiclороquina, a distintas concentraciones sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii*. Para ello, se analizan los parámetros clásicos de un estudio toxicológico: densidad celular, tasas de crecimiento, viabilidad celular y actividad fotosintética.

5. Material y métodos

5.1. Descripción de la especie

La especie utilizada en el estudio es *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard. La cepa (CCAP 11/32A mt+) se obtuvo de la Colección de Cultivos de Algas y

Protozoos (CCAP, *Culture Collection of Algae and Protozoa*) del Laboratorio Marino de Dunstaffnage (Escocia, Reino Unido).

De acuerdo con la clasificación de Bold (Bold & Wynne, 1985), el género *Chlamydomonas* forma parte de la división *Chlorophyta*, y se enmarca en la clase *Chlorophyceae*, orden *Volvocales* y familia *Chlamydomonadaceae*.

C. reinhardtii es una microalga verde dulceacuícola, unicelular y haploide de aproximadamente 10 µm (Merchant et al., 2007) muy empleada en estudios fisiológicos, bioquímicos, moleculares y genéticos que crece rápidamente en cultivos axénicos (Grossman et al., 2003).

Su importancia como microalga modelo en la investigación radica en que su ciclo vital es sencillo, se puede aislar fácilmente y se ha secuenciado su genoma (Harris, 2001; Rasala & Mayfield, 2011). En particular, es de gran utilidad en estudios toxicológicos debido a su gran sensibilidad frente a los contaminantes ambientales (Costa et al., 2016).

En cuanto a su biología celular, destaca la presencia de dos flagelos en su parte anterior con función locomotora, también empleados para el apareamiento (Merchant et al., 2007). Habitualmente, presenta numerosas mitocondrias y vesículas citoplasmáticas, junto a dos vacuolas contráctiles en el polo anterior de la célula (Merchant et al., 2007; Harris, 2009). Por su parte, el aparato de Golgi se sitúa frecuentemente alrededor del núcleo. Sus cloroplastos destacan por sus variadas morfologías, desde aquellos más simples en forma de canal o de copa, hasta los de mayor complejidad con forma de canasta. En ellos se pueden encontrar uno o más pirenoides y una mancha ocular (Harris, 2009).

C. reinhardtii se reproduce tanto de forma sexual (Harris, 2009) como asexual. Presenta dos tipos de células sexuales: *mating type plus* (+) y *mating type minus* (-) (Lv et al., 2022). Por ello, con la finalidad de evitar la reproducción sexual, en este estudio se han empleado células con sólo uno de los dos tipos de células, concretamente, el tipo *plus* (mt+).

5.2. Cultivo microalgal

Los cultivos *stock* de *Chlamydomonas reinhardtii* se preparan en matraces Erlenmeyer de 250 ml empleando el medio comercial GOLDMEDIUM – FWS (*Fresh Water Species*) cuya composición se detalla en el Anexo I. Para la preparación del cultivo axénico, se añaden 0,3 ml de una solución de oligoelementos (Algal-1, Nutrición Avanzada S.A.), 1 ml de cada una de las tres soluciones de nutrientes de este medio (Anexo I) y la cantidad de agua destilada

y de cultivo necesarios para obtener una densidad celular de 150.000 células ml^{-1} con un volumen final de cultivo de 100 ml. La densidad seleccionada permite ajustar el crecimiento de la microalga *C. reinhardtii* a una curva de crecimiento sigmoidea que alcance la fase estacionaria tras 72 h en los cultivos control o no expuestos al contaminante.

Los cultivos mantienen en una cámara con una temperatura constante de 22 °C, con ciclos de luz: oscuridad de 12:12 h y bajo unas condiciones de intensidad lumínica de 100 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y en agitación continua en un orbital a 150 rpm. Todo el material, medios y reactivos utilizados en este trabajo se esterilizaron en un autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

5.3. Contaminantes: Azitromicina e Hidroxicloroquina

La azitromicina (AZT) es un antibiótico macrólido de amplio espectro que inhibe la síntesis proteica bacteriana (da Luz et al., 2021). Está ampliamente distribuido y es detectado en aguas dulces en concentraciones de hasta 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Mao et al., 2021). Se utiliza para tratar infecciones bacterianas: enfermedades respiratorias, infecciones agudas de los senos paranasales y del oído, bronquitis crónica e infecciones de la garganta y las amígdalas. Además, también es efectivo contra la enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad ulcerosa genital e infecciones de la uretra y cuello uterino junto a infecciones de la piel (National Center for Biotechnology Information, 2023). Asimismo, se empleó durante la pandemia del SARS-CoV-2 para combatir la COVID-19 (Andreani et al., 2020).

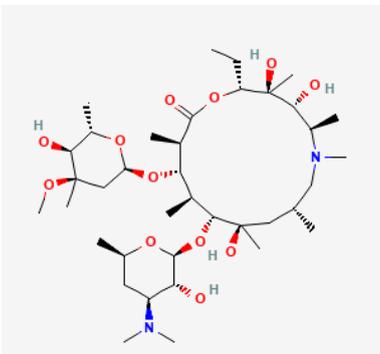
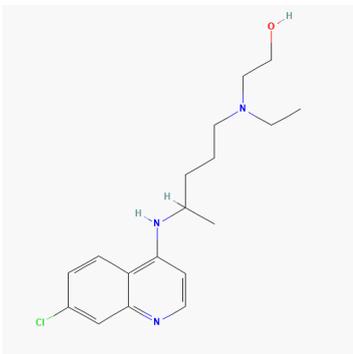
Este antibiótico se considera de especial relevancia ecotoxicológica debido a la elevada frecuencia con la que es detectado, junto a su consideración como persistente y tóxico a bajas concentraciones (Almeida et al., 2021).

Por su parte, la hidroxicloroquina (HCQ) es un medicamento antimalárico con propiedades quimioterapéuticas y antiinflamatorias, que frecuentemente se utiliza para tratar enfermedades como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico (Gümüş & Gümüş, 2022). Es detectado en las aguas en concentraciones de hasta 2,97 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Marques et al., 2023). Al igual que la AZT, en los inicios de la pandemia del SARS-CoV-2 fue recetado para combatir el COVID-19 por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales (Morgado-Carrasco et al., 2022). La HCQ se incluye en la Lista de Medicamentos Esenciales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Gümüş & Gümüş, 2022).

Los riesgos de este derivado de la quinolina en el medioambiente no se conocen con exactitud, pero, se ha descrito que tiene propiedades persistentes, tóxicas, cancerígenas y teratogénicas (Gümüş & Gümüş, 2022).

Las propiedades físico-químicas de ambos contaminantes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de la azitromicina e hidroxiclороquina.

Propiedades	Azitromicina ^a	Hidroxiclороquina ^b
Estructura química		
Fórmula molecular	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃ O
CAS Reg. N°.	83905-01-5	118-42-3
Masa molecular (g mol ⁻¹)	749,0	335,9
Solubilidad en agua (g l ⁻¹)	2,37 · 10 ⁻³ (25 °C)	2,61 · 10 ⁻²

^a <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/447043>

^b <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12947>

5.4. Preparación de las soluciones *stock* de los contaminantes

La solución *stock* de AZT utilizada en este estudio se elabora a partir de azitromicina dihidratada comercial (Sigma-Aldrich) en agua destilada a una concentración de 5 mg l⁻¹. Dicha solución se conserva a - 20°C.

Por su parte, la solución *stock* de HCQ se prepara a partir de hidroxiclороquina comercial (Sigma-Aldrich) en agua destilada a una concentración de 60 mg l⁻¹ y se conserva en una nevera a 4°C.

5.5. Análisis mediante citometría de flujo (CMF)

La citometría de flujo (CMF) es un método analítico que proporciona una medición rápida de características físicas y químicas de las células suspendidas en un fluido líquido, haciéndolas pasar de forma consecutiva e individualmente por una zona delimitada de análisis, produciendo una señal individual al ser iluminadas por un haz de láser. Con esta técnica se puede estudiar la complejidad y el tamaño celular, permitiendo analizar simultáneamente multitud de parámetros físico-químicos en células individuales (Barrera Ramírez et al., 2004).

El análisis de las células de *C. reinhardtii* se realiza en un citómetro de flujo CytoFLEX de Beckman Coulter, con un láser como una fuente de luz que emite a 488 nm (luz azul). Dicho equipo presenta cuatro detectores de fluorescencia según la longitud de onda captada: FL1 (505-550 nm, luz verde), FL2 (550-600 nm, luz amarilla), FL3 (600-645 nm, luz naranja) y FL4 (645-700 nm, luz roja, autofluorescencia de la clorofila) (Esperanza et al., 2019). La luz dispersada, normalmente 20° respecto del eje del haz de láser, es detectada por un canal o detector frontal (FSC, *Forward Scatter Channel*), cuya intensidad determina el tamaño de la partícula analizada y permite discriminar entre células y restos celulares. Por su parte, la luz dispersada aproximadamente 90° respecto del haz, es analizada en un detector lateral (SSC, *Side Scatter Channel*) que determina la complejidad intracelular de las células presentes en la muestra (Rahman, s. f.). Las células de *C. reinhardtii* se seleccionan en todos los protocolos en base a su tamaño (FSC) y contenido en clorofila (detector FL4).

5.5.1. Determinación de la densidad celular

El crecimiento celular de un cultivo es un parámetro ampliamente utilizado en estudios toxicológicos ya que refleja el estado fisiológico de las células. Para ello, se debe establecer previamente la densidad celular de los cultivos expresada en células ml⁻¹. En este trabajo se analiza cada 24 h hasta completar un total de 72 h de exposición a los contaminantes y se determina por medio del recuento del número de células microalgales presentes en los cultivos mediante CMF, a partir de 15 µl de cada muestra y condición experimental.

5.5.2. Determinación de las tasas de crecimiento

Se calculan las tasas de crecimiento (μ), expresadas en día⁻¹, para cada tratamiento y tiempo ensayado a partir de los datos de la densidad celular, aplicando la siguiente fórmula:

$$\mu = [\log(N_t) - \log(N_0)] / \log_2(t - t_0)$$

Dónde:

- N_0 y N_t : densidades celulares inicial y final durante el período estudiado, expresado en células ml⁻¹.
- t_0 y t : tiempos inicial y final del período estudiado, ambos expresados en días.

5.5.3. Análisis de la viabilidad celular

El estudio de la viabilidad celular se lleva cabo mediante CMF empleando para ello ioduro de propidio (IP). Este fluorocromo se excita a 488 nm y emite en torno a 625 nm.

Una característica en la que se basa este método de análisis es la integridad de la membrana, siendo un buen indicador de mortalidad celular, ya que dicha integridad es vital para el correcto funcionamiento de la célula (Buysschaert et al., 2016). Esta técnica se asienta en que una célula viable mantiene el control de transporte de sustancias a través de la membrana plasmática y, por lo tanto, el IP no es capaz de penetrar en ella debido a su tamaño y carga (células IP⁻). En cambio, si las células están muertas (no viables) no serán capaces de

controlarlo, por lo que el fluorocromo se introducirá en la célula, intercalándose en el ADN de doble cadena (células IP +). De esta forma, el empleo de IP se postula como un buen método para estudiar la viabilidad celular (Buysschaert et al., 2016).

Para realizar el análisis, se extraen 250 µl de cada una de las réplicas biológicas de cada tratamiento, y se preparan suspensiones celulares ajustando la densidad celular a 150.000 células ml⁻¹ en tampón fosfato salino pH 7,2 (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) y se añaden 2,5 µl de yoduro de propidio de una solución *stock* a 1 mg ml⁻¹.

Tras 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, las muestras se analizan en el citómetro en el detector FL3 y el resultado se expresa en porcentaje de células viables (células IP-) con respecto al total de células analizadas.

5.6. Análisis de la actividad fotosintética mediante fluorimetría de la modulación de amplitud de pulso (PAM)

Se monitoriza la actividad fotosintética de los cultivos tras 72 h de exposición a los contaminantes, empleando la fluorimetría de modulación de amplitud de pulso (PAM, *Pulse Amplitude Modulation*).

Para ello, se cuantifica la eficiencia fotosintética (QY, *Quantum Yield*) del fotosistema II (PSII, *Photosystem II*) utilizando el fluorímetro AquaPen-C-AP-100, que permite medir la fluorescencia de los pigmentos fotosintéticos de las células microalgales de forma rápida y precisa. Este dispositivo está equipado con un emisor LED azul (455 nm) que excita las clorofilas (mediciones de cultivos de algas y suspensiones de células vegetales) y un emisor LED rojo-naranja (630 nm), adecuado para mediciones en cianobacterias. La sensibilidad del fluorímetro es extremadamente elevada, permitiendo detectar hasta 0,5 µg clorofila l⁻¹ (Photon Systems Instruments, 2021)

La medición del QY del PSII (eficiencia en la conversión de la luz absorbida por el fotosistema en luz emitida en forma de fluorescencia) (Sadjadi, 2021), se basa en que cuando el PSII está funcionando en condiciones óptimas no es capaz de absorber toda la luz, emitiendo la luz restante en forma de fluorescencia, la cual es utilizada por el dispositivo para calcular la eficiencia fotosintética o QY. En cambio, si el rendimiento es malo, absorberá toda la luz recibida y la fluorescencia emitida será baja. Por lo tanto, las microalgas que están en

condiciones óptimas presentan valores elevados de QY, mientras que disminuirá en aquellas sometidas a estrés (Alaya Esmorís, 2021).

Se analizan 3 ml de muestra con 150.000 células ml^{-1} en tampón PBS de cada una de las réplicas de cada tratamiento, mantenidas 30 minutos en oscuridad con la finalidad de permitir la apertura de los centros de reacción del PSII (Salazar et al., 2016).

5.7. Cálculo de la concentración efectiva media (EC_{50})

Uno de los índices más empleados en estudios toxicológicos para evaluar el efecto de diversos contaminantes sobre el crecimiento microalgal es la concentración efectiva media (EC_{50} , *Half maximal Effective Concentration*). Se define como la cantidad del compuesto tóxico necesario para provocar una inhibición del 50% en el crecimiento de una especie. Su empleo permite comparar fácilmente los resultados experimentales obtenidos en distintos ensayos toxicológicos.

A partir de los datos de las tasas de crecimiento obtenidos mediante CMF, la determinación de la EC_{50} se realizó a las 24, 48 y 72 horas de exposición a cada contaminante utilizando el programa CompuSyn (Chou & Martin, 2005).

5.8. Diseño experimental

Para evaluar los posibles efectos tóxicos de la AZT y la HCQ sobre las células de *C. reinhardtii* se realizaron dos ensayos independientes con una duración de 72 h. Las concentraciones testadas para ambos contaminantes fueron 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 mg l^{-1} y 10, 15, 20, 25 y 30 mg l^{-1} , respectivamente.

Los cultivos se elaboran a una densidad inicial celular de 150.000 células ml^{-1} , añadiéndose 30 ml de cultivo a cada una de las 3 réplicas biológicas para cada condición experimental, incluidos los cultivos control. Los tratamientos se mantienen en agitación en un orbital a 150 rpm en las mismas condiciones de temperatura, duración e intensidad de luz mencionadas anteriormente para el cultivo *stock* microalgal.

El análisis de los parámetros de crecimiento celular se realiza a las 24, 48 y 72 h de exponerlos a los contaminantes, mientras que la viabilidad celular y actividad fotosintética se examina al término de los ensayos, transcurridas 72 h de cultivo (Figura 1).

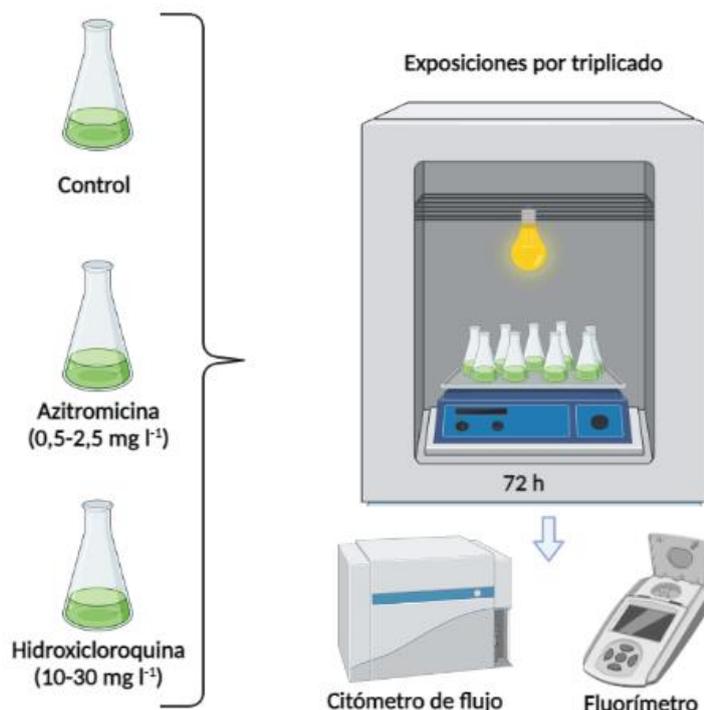


Figura 1. Composición gráfica en la que se ilustra el diseño experimental. Creada con la aplicación BioRender.

5.9. Análisis estadístico

Se determinaron las medias y las desviaciones estándar de las tres réplicas de cada tratamiento y los cultivos control para cada uno de los parámetros estudiados.

El análisis estadístico de los datos se realiza empleando el programa estadístico *IBM SPSS Statistics v. 27*. Para testar la hipótesis nula (H_0): “La concentración de contaminante emergente ensayado no afecta al parámetro de estudio”, se analiza estadísticamente mediante un análisis de la varianza de las medias de una vía (ANOVA, *Analysis of Variance*). Cuando se rechaza H_0 , es decir, cuando las diferencias son significativas, se utiliza una prueba *post hoc* denominada test de Tukey para determinar de dónde provienen las diferencias. El nivel de significación que se aplica es $\alpha = 0,05$ ($p\text{-valor} \leq 0,05$).

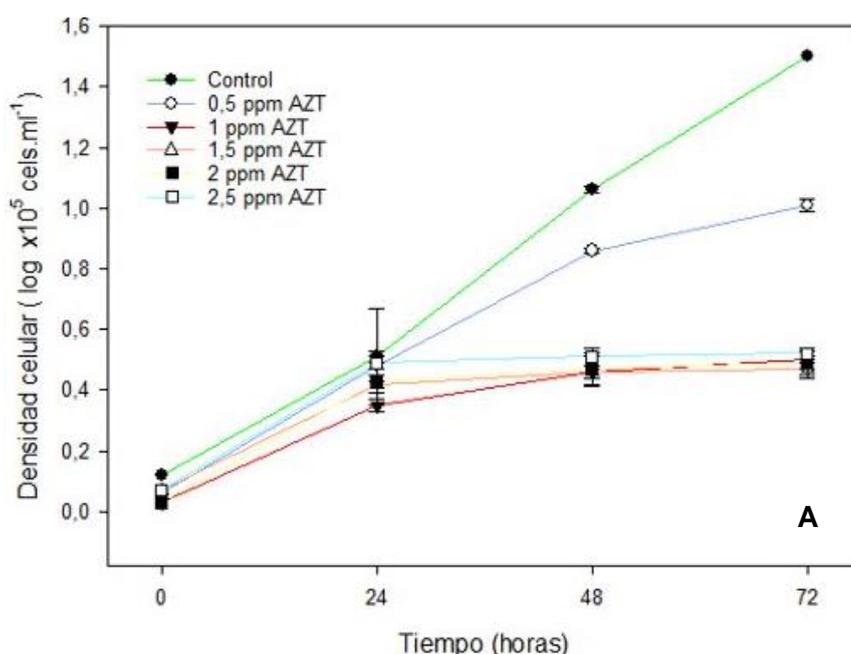
Las gráficas se diseñaron utilizando la plataforma de gráficos científicos y análisis estadístico *SigmaPlot v. 13.0*. En las tablas y figuras los resultados se expresan como la media de los valores obtenidos \pm la desviación estándar.

6. Resultados y discusión

6.1. Efectos de los contaminantes sobre el crecimiento microalgal

El crecimiento de los cultivos de *C. reinhardtii* se vio afectado por la presencia en el medio de AZT e HCQ a las concentraciones ensayadas.

En el transcurso de las primeras 24 h los cultivos expuestos al antibiótico AZT aumentaron su densidad celular, sin diferencias significativas entre los distintos tratamientos y con el control (p -valor $< 0,05$) (Figura 2A, Tabla 2). En el caso de la HCQ, también crecieron en dicho periodo de tiempo en una proporción similar al control, salvo a las concentraciones de 25 y 30 mg l^{-1} en las que se observó una fuerte inhibición (Figura 2B, Tabla 3). En cambio, se produjo una inhibición del crecimiento en todos los tratamientos expuestos a cualquiera de los contaminantes a partir de las 24 h, incrementándose dicho efecto a partir de la concentración de 1 mg l^{-1} , en el caso de la AZT y a partir de 15 mg l^{-1} en la HCQ y con el tiempo de exposición, en ambos casos (Tablas 2 y 3). En consecuencia, se observó que el efecto inhibitorio del crecimiento de ambos contaminantes sobre la microalga *C. reinhardtii* es concentración-dependiente, siendo más potente el ejercido por la AZT, donde la magnitud de las concentraciones ensayadas y las diferencias entre las mismas, son mucho menores que en la HCQ (Figuras 2A-B, Tablas 2 y 3). Resultados similares para la AZT fueron obtenidos por Mao et al. (2021). De la misma manera, Marques et al. (2023) reportaron afectación en el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* tras ser expuesta a la HCQ.



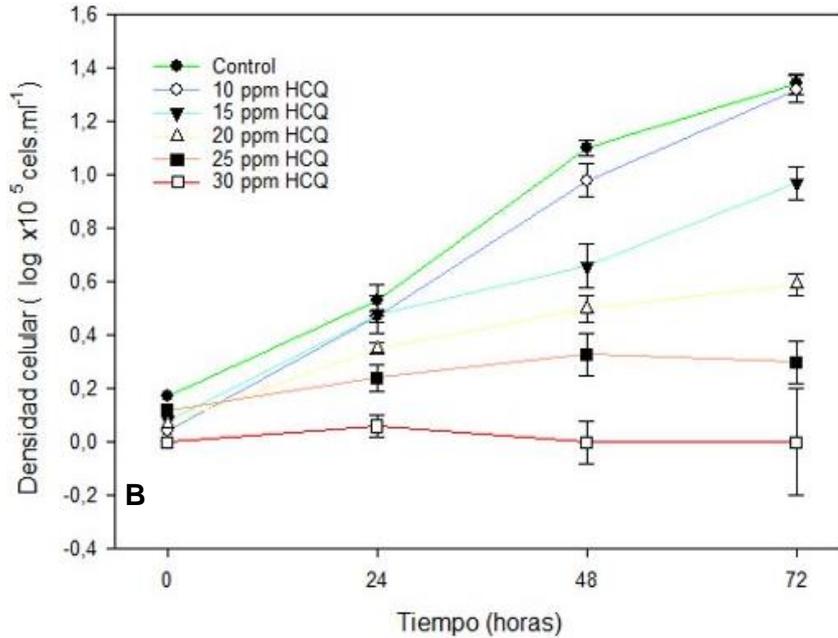


Figura 2. Dinámica de crecimiento de *Chlamydomonas reinhardtii* en respuesta a la exposición a la azitromicina (A) e hidroxiclороquina (B).

Por lo tanto, los resultados de este estudio muestran que la presencia de AZT en el medio de cultivo afecta significativamente al crecimiento de *C. reinhardtii* para todas concentraciones de contaminante ensayadas a partir de las 48 h de exposición (p -valor $< 0,05$) (Tabla 2). No se hallaron diferencias significativas en el nivel de afectación entre los tratamientos de 1 mg l^{-1} y superiores a lo largo del tiempo de estudio, observándose tan solo entre dichos tratamientos con respecto al tratado con la menor concentración de contaminante ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$). La HCQ también inhibió el crecimiento de la microalga, encontrándose diferencias significativas con respecto al control durante todo el periodo de estudio (p -valor $< 0,05$) para los tratamientos expuestos a 25 mg l^{-1} y superiores, y a partir 15 mg l^{-1} de HCQ a medida que se aumentó el tiempo de exposición (Tabla 3).

Tabla 2. Tasas de crecimiento de *C. reinhardtii* tras 24, 48 y 72 h de exposición a diferentes concentraciones de azitromicina.

Tasas de crecimiento			
Azitromicina (mg/l)	24 h	48 h	72 h
Control	$1,30 \pm 0,52^a$	$1,57 \pm 0,01^a$	$1,53 \pm 0,00^a$
0,5	$1,40 \pm 0,16^a$	$1,32 \pm 0,01^b$	$1,05 \pm 0,03^b$
1,0	$1,07 \pm 0,08^a$	$0,71 \pm 0,04^c$	$0,52 \pm 0,04^c$
1,5	$1,16 \pm 0,08^a$	$0,64 \pm 0,08^c$	$0,44 \pm 0,03^c$
2,0	$1,33 \pm 0,19^a$	$0,73 \pm 0,08^c$	$0,51 \pm 0,05^c$
2,5	$1,39 \pm 0,08^a$	$0,73 \pm 0,04^c$	$0,50 \pm 0,02^c$

Tabla 3. Tasas de crecimiento de *C. reinhardtii* tras 24, 48 y 72 h de exposición a diferentes concentraciones de hidroxiclороquina.

Tasas de crecimiento			
Hidroxiclороquina (mg/l)	24 h	48 h	72 h
Control	1,19 ± 0,20 ^{ab}	1,54 ± 0,05 ^a	1,29 ± 0,04 ^a
10	1,43 ± 0,08 ^a	1,56 ± 0,09 ^a	1,41 ± 0,05 ^a
15	1,33 ± 0,22 ^{ab}	0,96 ± 1,13 ^b	0,98 ± 0,07 ^b
20	0,94 ± 0,08 ^b	0,72 ± 0,09 ^b	0,58 ± 0,04 ^c
25	0,40 ± 0,17 ^c	0,36 ± 0,14 ^c	0,20 ± 0,09 ^d
30	0,22 ± 0,14 ^c	0,00 ± 0,14 ^d	0,00 ± 0,22 ^e

La EC₅₀ determinada para la AZT fue de 1,52 mg l⁻¹ y 0,80 mg l⁻¹ tras 48 y 72 h de exposición, respectivamente. No se obtuvo la concentración efectiva media para dicho contaminante tras 24 h de exposición, dado que no se observó un efecto inhibitorio estadísticamente significativo con respecto a los cultivos control (Tabla 2). La EC₅₀ de la HCQ fue de 24,96 mg l⁻¹; 19,16 mg l⁻¹ y 19,43 mg l⁻¹ a las 24, 48 y 72 h, respectivamente. En consecuencia, la toxicidad de ambos contaminantes sobre la microalga *C. reinhardtii* aumenta con el tiempo, siendo incapaces las células de superar la inhibición, ya que cuanto más tiempo transcurre es necesaria una menor cantidad de contaminante para provocar el mismo nivel de daño (salvo pequeñas diferencias entre la EC₅₀ de la hidroxiclороquina a las 48 y 72 h). Los valores obtenidos de EC₅₀ implican que, dado que se incluyen dentro de los rangos de solubilidad en agua de ambos contaminantes (Tabla 1), dichas concentraciones de contaminante se pueden encontrar en los medios acuáticos naturales.

6.2. Efectos de los contaminantes sobre la viabilidad celular

La viabilidad celular del cultivo de *C. reinhardtii* no se vio alterada por la presencia de AZT en el medio después de 72 h, mientras que la presencia de HCQ sí que provocó efectos sobre este parámetro.

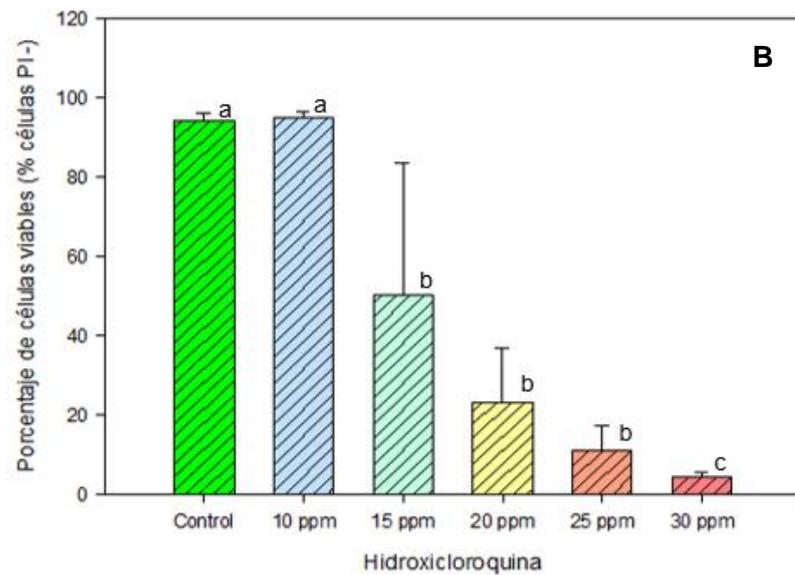
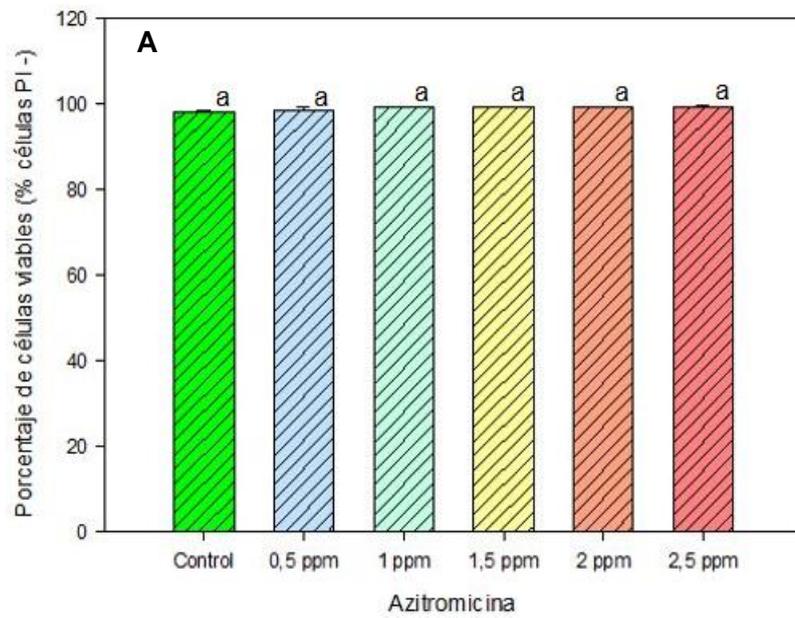
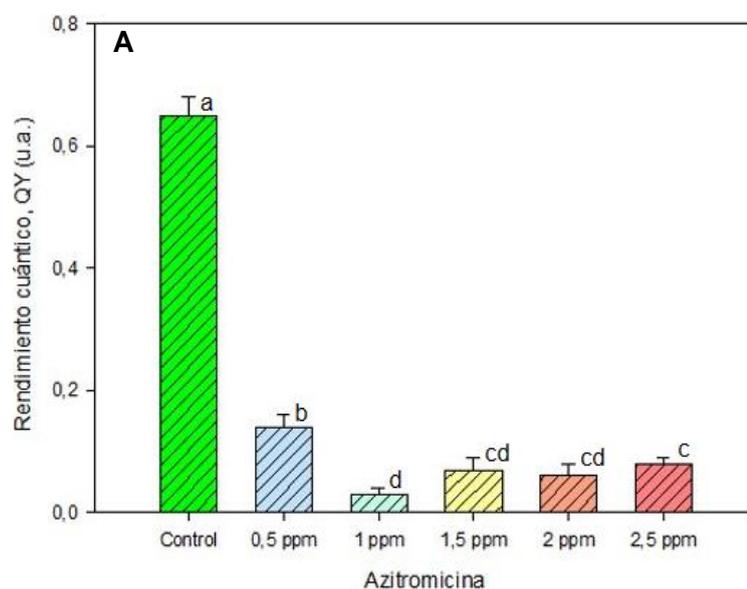


Figura 3. Efecto de la exposición a la azitromicina (**A**) e hidroxicloroquina (**B**) sobre la viabilidad celular de *Chlamydomonas reinhardtii*. Las letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Aquellos que tienen la misma letra indican que las diferencias no son significativas.

Los cultivos expuestos a la AZT presentaron un porcentaje de células viables (IP-) muy elevado, siempre superior al 97 % y similar al control cuyas diferencias no fueron estadísticamente significativas (p -valor $> 0,05$) (Figura 3A). Resultados similares fueron obtenidos por Almeida et al. (2021), los cuales tampoco hallaron afectación fotosintética en las concentraciones de contaminante más bajas ensayadas, observando un porcentaje de células viables en torno al 80%. En el caso de la HCQ, dicho porcentaje fue muy similar al del tratamiento expuesto a 10 mg l^{-1} donde las diferencias tampoco fueron significativas (Figura 3B). Sin embargo, se produjo una pérdida de gran magnitud en la viabilidad celular en los tratamientos expuestos a concentraciones de HCQ de 15 mg l^{-1} y superiores, cuyas diferencias respecto al control y al tratamiento de 10 mg l^{-1} fueron estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$). Dicha pérdida se incrementó a medida que se aumentó la concentración de contaminante en los cultivos, si bien, las diferencias observadas entre los tratamientos de 15 , 20 y 25 mg l^{-1} no fueron estadísticamente significativas entre sí. En cambio, sí lo fueron las encontradas entre la concentración de 30 mg l^{-1} respecto a los tratamientos de 15 , 20 y 25 mg l^{-1} cuyo porcentaje de viabilidad se situó en torno al 5%. A conocimiento de los autores, el presente estudio es el primero en el que se ha analizado la posible afectación de la hidroxiclороquina sobre la viabilidad celular de un organismo fotosintético como *Chlamydomonas reinhardtii*.

6.3. Efectos de los contaminantes sobre la actividad fotosintética

La actividad fotosintética de las células de *C. reinhardtii* se vio severamente afectada por la presencia de AZT en el medio, mientras que no se vio perjudicada por la presencia de HCQ.



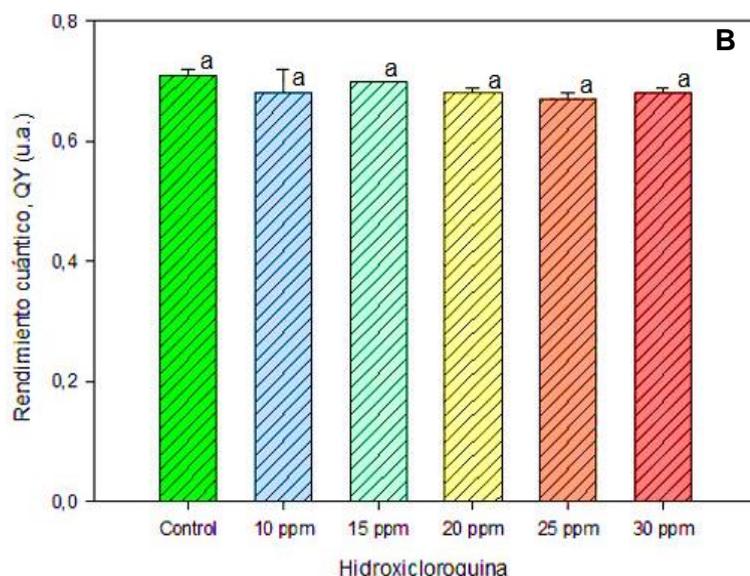


Figura 4. Efecto de la exposición a la azitromicina (A) e hidroxicloroquina (B) sobre la actividad fotosintética de *Chlamydomonas reinhardtii*. Las letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Aquellos que tienen la misma letra indican que las diferencias no son significativas.

Ante la presencia de AZT en el medio, los valores de QY del control difirieron en gran medida y de forma estadísticamente significativa, de los obtenidos en todos los tratamientos expuestos al contaminante (Figura 4A). De igual forma, se determinaron diferencias significativas entre el rendimiento fotosintético del tratamiento expuesto a $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ respecto a las concentraciones superiores del contaminante. Las concentraciones de 1 mg l^{-1} y superiores presentan un rendimiento fotosintético ínfimo, con diferencias muy pequeñas entre ellas, siendo tan solo significativas las obtenidas entre los tratamientos de 1 y $2,5 \text{ mg l}^{-1}$. Mao et al. (2021) también determinaron en su estudio afectación fotosintética en las células *C. reinhardtii* al ser expuestos al mismo contaminante.

Acorde a los resultados obtenidos en la medición de la fluorescencia, la presencia de HCQ no afectó al rendimiento fotosintético de las células microalgales (Figura 4B). Los valores de rendimiento cuántico del control y de todos los tratamientos fueron elevados, siendo las pequeñas diferencias encontradas entre ellos y con respecto al control, y no significativas ($p\text{-valor} > 0,05$).

La AZT ejerce su toxicidad inhibiendo la síntesis proteica al unirse al ARNr 23S de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Esto impide la realización del paso de transpeptidación y el ensamblaje de la subunidad 50S del ribosoma en la formación de proteínas, inhibiendo así su síntesis (Almeida et al., 2021). De esta forma, la AZT podría inhibir la síntesis de las proteínas situadas en el cloroplasto

de las microalgas, provocando alteraciones en el proceso fotosintético o, incluso, inhibiéndolo por completo, afectando finalmente al crecimiento celular (Liu et al., 2011), tal y como se confirma en el presente estudio.

Por otra parte, algunos compuestos tóxicos pueden provocar una reducción de la tasa de transporte de electrones en los centros de reacción del PSII (Franqueira et al., 2000), lo que promueve la formación especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*). Las ROS tienen como principal diana en los organismos fotosintéticos los centros de reacción del fotosistema I (PSI, *Photosystem I*) y PSII situados en los tilacoides del cloroplasto, lo que provocaría daños en las membranas celulares y la consecuente pérdida de viabilidad celular (Almeida et al., 2021). Por lo tanto, debido a las alteraciones observadas en la viabilidad celular (HCQ) y en la fotosíntesis (AZT), se debería estudiar a futuro la producción de ROS frente a ambos contaminantes.

En la Tabla 4 se muestran resumidos los principales resultados obtenidos en este estudio.

Tabla 4. Evaluación de la afectación al crecimiento, viabilidad y actividad fotosintética de las células de *Chlamydomonas reinhardtii* tras 72 h de exposición a la AZT e HCQ. Las flechas orientadas hacia abajo indican una disminución significativa en el parámetro de estudio con respecto al control, indicándose la concentración a partir de la cual se observaron dichas diferencias. El signo “=” denota diferencias no significativas en el parámetro de estudio con respecto al control.

72h	AZT	HCQ
Crecimiento	↓ (0,5 mg l ⁻¹)	↓ (15 mg l ⁻¹)
Viabilidad	=	↓ (15 mg l ⁻¹)
Fotosíntesis	↓ (0,5 mg l ⁻¹)	=

7. Conclusiones

El presente estudio demuestra que la azitromicina inhibe el crecimiento de *C. reinhardtii*, incluso a las concentraciones más bajas ensayadas (0,5-2,5 mg l⁻¹), mientras que, la hidroxiclороquina, ejerce su toxicidad a concentraciones más altas de contaminante (15-30 mg l⁻¹). Esto se ve reflejado en los valores de EC₅₀ de ambos contaminantes: 1,52 mg l⁻¹ y 0,80 mg l⁻¹ para la AZT (tras 48 h y 72 h de exposición, respectivamente) y 24,96 mg l⁻¹; 19,16 mg l⁻¹ y 19,43 mg l⁻¹ para la HCQ (tras 24, 48 y 72 h, respectivamente). La inhibición del crecimiento es concentración-dependiente en ambos antimicrobianos.

La AZT disminuye fuertemente el rendimiento fotosintético a todas las concentraciones ensayadas. Se determinó que la presencia de AZT no disminuye la viabilidad celular.

La exposición de *C. reinhardtii* a concentraciones elevadas de HCQ disminuye fuertemente la viabilidad de sus células. La actividad fotosintética de las células de *C. reinhardtii* no se ve afectada por la presencia de HCQ en el medio.

Conclusión

O presente estudo demostra que a azitromicina inhibe o crecemento de *C. reinhardtii*, incluso as concentracións máis baixas ensaiadas (0,5-2,5 mg l⁻¹), mentres que, a hidroxiclороquina, exerce a súa toxicidade a concentracións máis altas de contaminante (15-30 mg l⁻¹). Isto vese reflexado nos valores de EC₅₀ de ambos contaminantes: 1,52 mg l⁻¹ e 0,80 mg l⁻¹ para a AZT (tras 48 h e 72 h de exposición, respectivamente) e 24,96 mg l⁻¹; 19,16 mg l⁻¹ e 19,43 mg l⁻¹ para a HCQ (tras 24, 48 y 72 h, respectivamente). A inhibición do crecemento é concentración-dependente en ambos antimicrobianos.

A AZT diminúe fortemente o rendemento fotosintético a todas as concentracións ensaiadas. Determinouse que a presenza de AZT non diminúe a viabilidade celular.

A exposición de *C. reinhardtii* a concentracións elevadas de HCQ diminúe fortemente a viabilidade das súas células. A actividade fotosintética das células de *C. reinhardtii* non se ve afectada pola presenza de HCQ no medio.

Conclusions

The present study shows that azithromycin inhibits the growth of *C. reinhardtii*, even at the lowest concentrations tested (0.5-2.5 mg l⁻¹), while hydroxychloroquine exerts its toxicity at higher contaminant concentrations (15-30 mg l⁻¹). This is reflected in the EC₅₀ values for both contaminants: 1.52 mg l⁻¹ and 0.80 mg l⁻¹ for AZT (after 48 h and 72 h of exposure, respectively) and 24.96 mg l⁻¹; 19.16 mg l⁻¹ and 19.43 mg l⁻¹ for HCQ (after 24, 48 and 72 h, respectively). Growth inhibition is concentration-dependent for both antimicrobials.

AZT strongly decreases photosynthetic yield at all concentrations tested. The presence of AZT was not found to decrease cell viability.

Exposure of *C. reinhardtii* to high concentrations of HCQ strongly decreases the viability of its cells. The photosynthetic activity of *C. reinhardtii* cells is not affected by the presence of HCQ in the medium.

8. Bibliografía

- Almeida, A. N., Gomes, T., Baz Lomba, J. A. & Lillicrap, A. (2021). Specific toxicity of azithromycin to the freshwater microalga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 222, 112553. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112553>
- Andreani, J., Le Bideau, M., Duflot, I., Jardot, P., Rolland, C., Boxberger, M., Wurtz, N., Rolain, J. M., Colson, P., La Scola, B. & Raoult, D. (2020). In vitro testing of combined hydroxychloroquine and azithromycin on SARS-CoV-2 shows synergistic effect. *Microbial Pathogenesis*, 145, 104228. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104228>
- Barrera Ramírez, L. M., Drago Serrano, M. E., Pérez Ramos, J., Sainz Espuñes, T. D. R., Zamora, A. C., Gómez Arroyo, F. & Mendoza Pérez, F. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(1), 42-55.
- Bold, H. C. & Wynne, M. J. (1985). Introduction to the Algae. Prentice Hall. *Inc. New Jersey*, 720, 573-574.
- Buyschaert, B., Byloos, B., Leys, N., Van Houdt, R. & Boon, N. (2016). Reevaluating multicolor flow cytometry to assess microbial viability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(21), 9037-9051. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7837-5>
- Chou, T. C. & Martin, N. (2005). CompuSyn for drug combinations: PC software and user's guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC50 and ED50 and LD50 values. *ComboSyn, Paramus, NJ*.
- da Costa, C. H., Perreault, F., Oukarroum, A., Melegari, S. P., Popovic, R. & Matias, W. G. (2016). Effect of chromium oxide (III) nanoparticles on the production of

reactive oxygen species and photosystem II activity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Science of the Total Environment*, 565, 951-960. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.028>

Dalu, T. & Tavengwa, N. T. (2022). *Emerging freshwater pollutants: analysis, fate and regulations*. Elsevier.

Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C. & Cid, A. (2019). Differential toxicity of the UV-filters BP-3 and BP-4 in *Chlamydomonas reinhardtii*: a flow cytometric approach. *Science of The Total Environment*, 669, 412-420. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.116>

Franqueira, D., Orosa, M., Torres, E., Herrero, C. & Cid, A. (2000). Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. *Science of The Total Environment*, 247(2), 119-126. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00483-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00483-0)

Grossman, A. R., Harris, E. E., Hauser, C., Lefebvre, P. A., Martinez, D., Rokhsar, D., Shrager, J., Silflow, C. D., Stern, D., Vallon, O. & Zhang, Z. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* at the crossroads of genomics. *Eukaryotic Cell*, 2(6), 1137-1150. <https://doi.org/10.1128/EC.2.6.1137-1150.2003>

Guindon, G. E., Fatima, T., Garasia, S. & Khoee, K. (2022). A systematic umbrella review of the association of prescription drug insurance and cost-sharing with drug use, health services use, and health. *BMC Health Services Research*, 22(1), 1-33. <https://doi.org/10.1186/s12913-022-07554-w>

Gümüş, D. & Gümüş, F. (2022). Removal of hydroxychloroquine using engineered biochar from algal biodiesel industry waste: characterization and design of experiment (DoE). *Arabian Journal for Science and Engineering*, 47(6), 7325-7334. <https://doi.org/10.1007/s13369-021-06235-w>

- Harris, E. H. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 363-406.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.363>
- Harris, E. H. (2009). *The Chlamydomonas sourcebook: introduction to Chlamydomonas and its laboratory use: volume 1*. Academic Press.
- Liu, B., Nie, X., Liu, W., Snoeijs, P., Guan, C. & Tsui, M. T. K. (2011). Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole on photosynthetic apparatus in *Selenastrum capricornutum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4), 1027-1035. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.01.022>
- da Luz, T. M., da Costa Araújo, A. P., Neves Estrela, F., Bezerra Braz, H. L., Bezerra Jorge, R. J., Charlie-Silva, I. & Malafaia, G. (2021). Can use of hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19 affect aquatic wildlife? A study conducted with neotropical tadpole. *Science of The Total Environment*, 780, 146553.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146553>
- Lv, Y., Han, F., Liu, M., Zhang, T., Cui, G., Wang, J., Yang, Y., Yang, Y-G. & Yang, W. (2022). Characteristics of N6-methyladenosine modification during sexual reproduction of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2022.04.004>
- Mao, Y., Yu, Y., Ma, Z., Li, H., Yu, W., Cao, L. & He, Q. (2021). Azithromycin induces dual effects on microalgae: roles of photosynthetic damage and oxidative stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 222, 112496.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112496>
- Marques, R. Z., Kochi, L. Y., Guzman-Tordecilla, M., Malage, L., Juneau, P. & Gomes, M. P. (2023). COVID-19 pharmaceuticals in aquatic matrices: the threatening

effects over cyanobacteria and microalgae. *Science of The Total Environment*, 892, 164309. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164309>

Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W. F., Qu, L-H., Nelson, D. R., Sanderfoot, A. A., Spalding, M. H., Kapitonov, V. V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., ... Grossman, A. R. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5848), 245-250. <https://doi.org/10.1126/science.1143609>

Ministerio Para la Transición Ecológica y El Reto Demográfico. (s.f.). *Contaminantes emergentes*. <https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/estado-y-calidad-de-las-aguas/contaminantes-emergentes/>

Morgado-Carrasco, D., Ibaceta-Ayala, J. & Piquero-Casals, J. (2022). La hidroxiclороquina como fármaco fundamental en dermatología y su papel controvertido en la COVID-19. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, 113(2), 166-175. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2021.07.005>

Moro, I., Matozzo, V., Piovan, A., Moschin, E. & Vecchia, F. D. (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>

Naskar, J., Boatemaa, M. A., Rumjit, N. P., Thomas, G., George, P. J., Lai, C. W., Mousavi, S. M. & Wong, Y. H. (2022). Recent advances of nanotechnology in mitigating emerging pollutants in water and wastewater: status, challenges, and opportunities. *Water, Air & Soil Pollution*, 233(5), 156. <https://doi.org/10.1007/s11270-022-05611-y>

- National Center for Biotechnology Information. (2023). *Azithromycin*. PubChem.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/447043>
- Nie, X-P., Liu, B-Y., Yu, H-J., Liu, W-Q. & Yang, Y-F. (2013). Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole exposure to the antioxidant system in *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Pollution*, 172, 23-32.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.08.013>
- Omar, W. M. W. (2010). Perspectives on the use of algae as biological indicators for monitoring and protecting aquatic environments, with special reference to Malaysian freshwater ecosystems. *Tropical Life Sciences Research*, 21(2), 51-67.
- Photon Systems Instruments. (2021). *AquaPen-C AP 110-C and AquaPen-P AP 110-P: manual and user guide*.
https://handheld.psi.cz/documents/AquaPen_Manual-verze_02_2021.pdf
- Puri, M., Gandhi, K. & Kumar, M. S. (2023). Emerging environmental contaminants: a global perspective on policies and regulations. *Journal of Environmental Management*, 332, 117344. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117344>
- Rahman, M. (s. f.). *Introduction to Flow Cytometry*. AbD Serotec.
<https://flowcytometry.gwu.edu/sites/g/files/zaskib311/files/2021-11/Introduction%20Flow%20Cytometry-AbD%20Serotec%282%29.pdf>
- Rasala, B. A. & Mayfield, S. P. (2011). The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform for the production of human protein therapeutics. *Bioengineered Bugs*, 2(1), 50-54. <https://doi.org/10.4161/bbug.2.1.13423>

- Reinoso Carrasco, J. del C., Serrano Delgado, C. Y. & Orellana Cobos, D. F. (2017). Contaminantes emergentes y su impacto en la salud. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuenca*, 35(2), 55-59
- Sadjadi, S. (2021). *Emerging Carbon Materials for Catalysis: the utility of carbon dots for photocatalysis*. Elsevier.
<https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/quantum-yield>
- Salazar, C., Pino, M. T. & Villagra, P. (2016). La emisión de fluorescencia de la clorofila a: una herramienta para la detección del efecto del estrés hídrico en el aparato fotosintético de la papa. En *Boletín INIA* (p. 15). Instituto de Investigaciones Agropecuarias.
- Varó Galvañ, P. J., López Ortiz, C. M., Cases López, V. P. & Ramírez Caballero, M. L. (2016). Presencia de contaminantes emergentes en aguas naturales [tesis doctoral, Universidad de Alicante].
https://agroambient.gva.es/documents/163005665/163975683/UA_Presencia+contaminantes+emergentes+en+aguas+naturales.pdf/bd71c431-e80b-4810-9870-03fad0420fa4

9. Anexo I

9.1. Composición del medio GOLDMEDIUM-FWS:

Solución 1: 51,5 g de la mezcla de $\text{NaNO}_3 + \text{KH}_2\text{PO}_4$. Disolver en agua destilada y completar hasta 1000ml.

Solución 2: 15,0 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Disolver en agua destilada y completar hasta 1000ml.

Solución 3: 0,5 g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Disolver en agua destilada y completar hasta 1000ml.

Solución de Oligoelementos: 0,25 g de Algal en 50 ml de H_2O destilada.

Esterilización en autoclave de las soluciones a 121°C durante 20 min.