



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grao en Bioloxía

Facultade de Ciencias
Departamento de Bioloxía
Área de Microbioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Toxicidad de un producto de higiene personal (triclosán) sobre la microalga marina *Tetraselmis suecica*: efecto de un incremento de temperatura

Toxicidade dun produto de hixiene persoal (triclosán) sobre a microalga mariña *Tetraselmis suecica*: efecto dun incremento da temperatura

Personal care product toxicity (triclosan) on the marine microalga *Tetraselmis suecica*: effect of a temperature increase

Alba Fernández Rodríguez

Julio, 2017

*Tutores Académicos: Ángeles Cid Fernández
Marta Seoane Méndez*

Índice:

Resumen/Resumo/Abstract.....	1
Palabras clave.....	1
1.INTRODUCCIÓN.....	3
2.OBJETIVO.....	4
3.MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3.1 Descripción de la especie utilizada.....	4
3.2 Descripción del contaminante utilizado: Triclosán.....	5
3.3 Cultivo microalgal.....	6
3.4 Determinación del crecimiento celular.....	6
3.5 Determinación de clorofilas y carotenoides.....	6
3.6 Análisis de la actividad celular.....	7
3.7 Análisis de la peroxidación lipídica.....	7
3.8 Diseño experimental.....	8
3.9 Análisis estadístico.....	8
4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4.1 Crecimiento celular.....	8
4.2 Clorofilas y carotenoides.....	10
4.3 Actividad celular.....	12
4.4 Peroxidación lipídica.....	14
5. CONCLUSIONES/CONCLUSIÓN/CONCLUSIONS.....	17
6.BIBLIOGRAFÍA.....	19

RESUMEN/ RESUMO/ ABSTRACT

Los contaminantes emergentes, entre los que se encuentran los productos de higiene personal, suponen un riesgo ambiental en los ecosistemas acuáticos, debido al potente efecto negativo que pueden provocar sobre la biota allí presente, sobre todo en las microalgas por ser los principales productores primarios en estos ambientes, con la consecuente importancia que ello supone en la cadena trófica. En el caso concreto del triclosán, su presencia ya se ha detectado en ecosistemas acuáticos de todo el mundo, incluyendo Galicia.

Por otra parte, la emisión de gases de efecto invernadero hacia la atmósfera está provocando un aumento de la temperatura media del planeta. Este aumento de la temperatura, debido al cambio climático, puede ocasionar alteraciones en las actividades metabólicas normales de los organismos.

En el presente trabajo, se analiza el efecto negativo del triclosán y del aumento de la temperatura en la microalga marina *Tetraselmis suecica* a través del estudio del crecimiento, contenido en pigmentos, actividad celular y peroxidación lipídica de la misma.

La exposición a triclosán durante un período de 72 horas provocó un descenso significativo ($p < 0,05$) del crecimiento, del contenido de pigmentos y de la actividad celular, sin embargo, sólo se obtuvieron diferencias significativas a las 24 horas en la peroxidación lipídica. En cuanto a la temperatura, se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) para el contenido de pigmentos, tanto de clorofila *a* como de carotenos, mostrando además interacción significativa ($p < 0,05$) entre el aumento de la temperatura y la presencia de triclosán.

Palabras clave: Triclosán, PCP, contaminante, microalga, *Tetraselmis suecica*, temperatura, toxicidad.

Os contaminantes emerxentes, entre os que se encontran os produtos de hixiene persoal, supoñen un risco ambiental nos ecosistemas acuáticos, debido ao potente efecto negativo que poden provocar sobre a biota alí presente, sobre todo nas microalgas por ser os principais produtores primarios nestos ambientes, coa consecuente importancia que eso supón na cadea trófica. No caso concreto do triclosán, xa se teñen detectado cantidades de dito contaminante nos ecosistemas acuáticos de todo o mundo, incluíndo Galicia.

Por outra banda, a emisión de gases de efecto invernadeiro hacia a atmosfera está provocando un aumento da temperatura media do planeta. Este aumento da temperatura, debido ao cambio climático, pode ocasionar alteracións nas actividades metabólicas normais dos organismos.

No presente traballo, analízase o efecto negativo do triclosán e dun aumento da temperatura na microalga mariña *Tetraselmis suecica* a través do estudo do

crecemento, contido en pigmentos, actividade celular e peroxidación lipídica da mesma.

A exposición de triclosán durante un periodo de 72 horas provocou un descenso significativo ($p < 0,05$) do crecemento, do contido de pigmentos e da actividade celular, porén, non se obtiveron diferencias significativas en canto a peroxidación lipídica. En canto a temperatura, obtivéronse datos significativos ($p < 0,05$) para o contido de pigmentos e actividade celular, mostrando ademáis interacción significativa ($p < 0,05$) entre o aumento de temperatura e a presenza de triclosán.

Palabras clave: Triclosán, PCP, contaminante, microalga, *Tetraselmis suecica*, temperatura, toxicidade.

Emerging pollutants, including personal care products, pose an environmental risk in aquatic ecosystems, due to the potent negative effect they can cause on the biota present there, especially in microalgae as the main primary producers in these environments, with the consequent importance that this supposes in the trophic chain. In the specific case of triclosan, its presence has already been detected in aquatic ecosystems around the world, also in Galicia.

On the other hand, the emission of greenhouse gases towards the atmosphere is causing an increase of the average temperature of the planet. This increase in temperature, due to climate change, can cause alterations in the normal metabolic activities of organisms.

In the present work, the negative effect of triclosan and temperature increase on the *Tetraselmis suecica* marine microalga are analyzed through the study of growth, pigment content, cellular activity and lipid peroxidation.

Exposure to triclosan over a period of 72 hours resulted in a significant ($p < 0.05$) decrease in growth, pigment content and cellular activity, however, only significant differences were obtained at 24 hours in lipid peroxidation. As regards temperature, significant differences ($p < 0.05$) were obtained for the content of pigments, both chlorophyll a and carotene, showing a significant interaction ($p < 0.05$) between the increase in temperature and presence of triclosan.

Keywords: Triclosan, PCP, pollutant, microalgae, *Tetraselmis suecica*, temperature, toxicity.

1. INTRODUCCIÓN

Los productos de higiene personal (PCPs del inglés Personal Care Products), cada vez más usados en nuestra sociedad, son un grupo muy diverso de sustancias de uso doméstico utilizadas con fines farmacéuticos, cosméticos y/o de limpieza. Algunos de ellos son desinfectantes (como el triclosán, contaminante elegido en este estudio), fragancias, filtros solares, repelentes de insectos, conservantes, etc. (Montes-Grajales, Fennix-Agudelo and Miranda-Castro, 2017). Como consecuencia de su uso abusivo, muchos de ellos acaban en los ecosistemas acuáticos, ejerciendo su toxicidad en la biota allí presente. El problema aún se puede agravar más cuando estos compuestos no se metabolizan completamente, ya que pueden generar productos más tóxicos que el contaminante original (Coogan *et al.*, 2007).

A pesar de todo, la preocupación llegó cuando se descubrió que una gran parte de estos productos actuaban como disruptores endocrinos, con las implicaciones que esto suponía en el medio ambiente (Veldhoen *et al.*, 2007). Algunos de los muchos efectos encontrados en la naturaleza incluyen: disminución del grosor de la cáscara de los huevos de las aves, feminización de peces macho, problemas en el sistema reproductivo en los peces, aves y mamíferos y cambios en el sistema inmunológico de mamíferos marinos. En el caso de los seres humanos, los disruptores endocrinos pueden reducir la cantidad de espermatozoides, aumentan la incidencia de cáncer de testículo y de próstata en los hombres y en el caso de las mujeres favorecen la endometriosis (Lister and Van Der Kraak, 2001). El efecto de estos contaminantes en el medio no sólo depende de su concentración, sino también de otros factores como la lipofilia, el potencial de bioacumulación y de su capacidad de eliminación (Esplugas *et al.*, 2007).

Dentro de los productos de higiene personal se encuentra el triclosán, un compuesto que ya se ha encontrado en pequeñas cantidades en la sangre, orina y en la leche materna (Allmyr *et al.*, 2006). Fue desarrollado hace 45 años y su uso aumentó considerablemente en los últimos 25. Es muy utilizado en América del Norte, Europa y Asia como desinfectante en jabones, detergentes, pasta de dientes, etc., siendo eficaz contra muchos tipos de bacterias y de ciertos tipos de hongos. Se trata de un compuesto halogenado que, durante el proceso de tratamiento de aguas residuales se metaboliza a metil-triclosán (más tóxico y persistente) y a otros compuestos como dioxinas y cloroformo (Dann and Hontela, 2011).

Por otra parte, la emisión constante de gases de efecto invernadero hacia la atmósfera, debido principalmente a las actividades antropogénicas, provoca cambios en las condiciones ambientales a las que las especies se deberán de adaptar. El aumento de la temperatura y la acidificación de los océanos son algunos de los efectos ocasionados por esta emisión de estos gases. Por ello, resulta muy importante conocer las posibles interacciones entre los contaminantes y otros factores relacionados con el estrés ambiental (Crain *et al.*, 2008).

Las microalgas constituyen la base de los ecosistemas acuáticos, por lo que juegan un papel muy importante en su equilibrio. Cualquier alteración en la población

fitoplanctónica puede repercutir sobre el resto de los organismos presentes en el ecosistema (Campanella *et al.*, 2001; Lüring and Roessink, 2006). Se trata de microorganismos fotosintéticos, adecuados para ensayos de toxicidad *in vitro* debido a sus características y a su posición en la cadena alimentaria (Seoane *et al.*, 2017), siendo posible conocer las alteraciones de estos microorganismos cuando se exponen a ciertas cantidades de contaminantes emergentes y a algún otro factor de estrés ambiental, como la temperatura.

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es determinar la toxicidad del triclosán combinado con un cambio de temperatura, sobre la microalga marina *Tetraselmis suecica*.

Para alcanzar este objetivo general:

- Se llevará a cabo el análisis del crecimiento, contenido en pigmentos, actividad celular y nivel de estrés oxidativo mediante el análisis de la peroxidación lipídica.
- Se comprobará si un factor de estrés añadido como la temperatura, puede llegar a potenciar el efecto del triclosán en *T. suecica*.

Con esto, estudiaremos si un aumento de la temperatura podría llegar a potenciar los efectos tóxicos de estos contaminantes para aproximarnos, lo máximo posible, a las características ambientales que estamos viviendo en la actualidad debido al cambio climático.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción de la especie utilizada

La especie utilizada en este trabajo fue la microalga marina *Tetraselmis suecica*, perteneciente a la clase Chlorophyceae, orden Volvocales y familia Chlamydomonadaceae, dentro de la división Chlorophyta. Se trata de una microalga marina unicelular móvil de color verdoso por la presencia de clorofila *a* y *b* (Fig. 1) Posee una forma ovalada y su tamaño celular está comprendido entre 10-15 μm de longitud y entre 7-9 μm de diámetro. Presenta cuatro flagelos, todos ellos de igual longitud que emergen en pares de una depresión cerca del ápice. La cubierta celular está formada por una teca compuesta por 2-3 estratos producidos por partículas escamosas de aspecto cristalino que derivan del aparato de Golgi. Posee un núcleo central, un plasto acopado lobulado en la parte anterior y un pirenoide basal. La reproducción se realiza por división celular binaria momento en el cual las células pierden el estado móvil, y las dos células hijas ya están completamente flageladas antes de la liberación de la teca (Butcher, 1959).

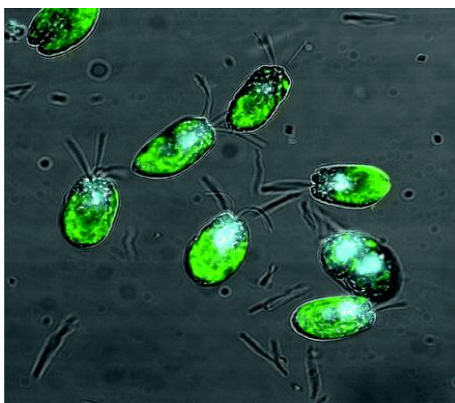


Figura 1. Fotografía de *Tetraselmis suecica*. Tomada de:

<http://rsif.royalsocietypublishing.org/content/early/2009/12/22/rsif.2009.0322>

Esta microalga tiene un potencial interés industrial, ya que es usada tanto en acuicultura para alimento de bivalvos, larvas de camarón y rotíferos (Fábregas *et al.*, 2001), en cosmética (Morineau-Thomas *et al.*, 2001) y para la producción de metabolitos de interés comercial como es el caso del biodiésel (Teo *et al.*, 2014) o de Vitamin E (α -tocopherol) (Carballo-Cardenas *et al.*, 2003).

3.2 Descripción del contaminante utilizado: Triclosán

El 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol, (con fórmula molecular $C_{12}H_7Cl_3O_2$) (Fig. 2) más conocido como triclosán, bloquea la biosíntesis de lípidos inhibiendo específicamente la enzima enoyl-acil vehículo proteína reductasa (ENR) (Wilson *et al.*, 2003). En el período comprendido entre 1992 y 1999, la mayoría de los productos antibacterianos del mercado contenían TCS como ingrediente activo (Schweizer, 2001).

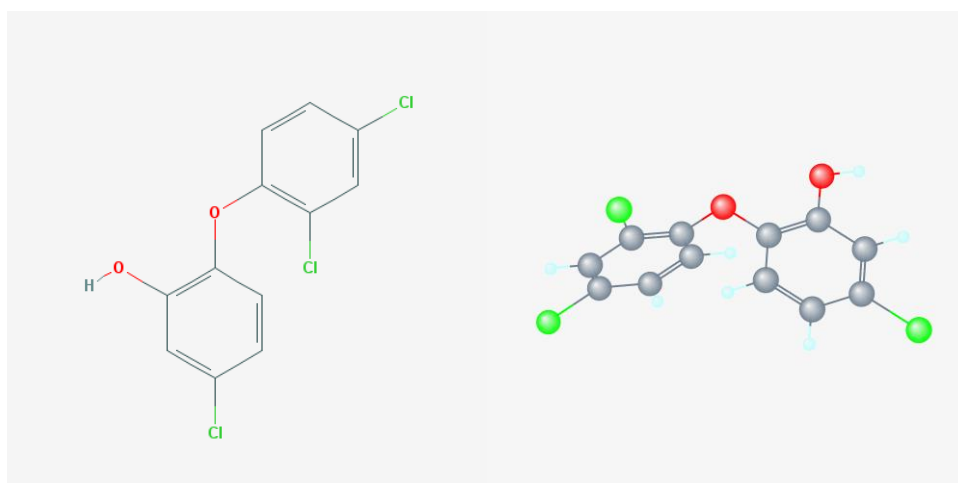


Figura 2: Estructura química en 2D y en 3D de Triclosán. Tomada de:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5564#section=Top>

Se trata de un compuesto no volátil, relativamente estable, soluble en soluciones alcalinas y muchos disolventes orgánicos (O'Neil *et al.*, 2001). Sin embargo, es poco

soluble en agua (10 mg/L a 20°C) (Yalkowsky *et al.*, 2010). Presenta un punto de ebullición a 120°C y de fusión a 55-57°C. Su constante de disociación (Pka) es de 7,9 (O'Neil *et al.*, 2001). De esta forma, el pH de las aguas superficiales tiene una gran influencia sobre su especiación y, por tanto, sobre su destino mediambiental y su comportamiento.

3.3 Cultivo microalgal

Los cultivos de *Tetraselmis suecica* se realizan en agua de mar filtrada a 0,22 µm y esterilizada en autoclave a 120°C durante 20 minutos. El medio de cultivo que hemos usado fue Algal-1 (Fabregas *et al.*, 1984).

El cultivo stock de *Tetraselmis suecica* se realizan en botellas Pyrex de 1 l y se mantienen en una cámara de cultivo en la que las condiciones de luz, temperatura y aireación se mantienen controladas. Esta última se mantiene constante, insuflando aire mediante un turbosoplador. La temperatura se mantiene a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, con una intensidad lumínica aproximada $70 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$, producida por tubos fluorescentes TLD Phillips de 36W.

Los cultivos para cada una de las experiencias se llevan a cabo en tubos Kimax con 40 ml de medio y una densidad celular inicial de 2×10^5 células.

3.4 Determinación del crecimiento celular

Se llevan a cabo recuentos celulares de cada réplica de los cultivos ensayados en cámara Neubauer y con un microscopio óptico de contraste de fases *NIKON Labophot*. Dado que son células móviles, previamente al recuento, las células se fijan con 0,2 µl de lugol.

A partir de los recuentos celulares se calcula la tasa de crecimiento mediante la fórmula:

$$T_c = (\ln(N_f) - \ln(N_0)) / \ln 2 (t_f - t_0)$$

Dónde T_c es la tasa de crecimiento expresada en días⁻¹, t_0 y t_f son el tiempo inicial y final, expresados en días, y N_0 y N_f son el número de células en ml⁻¹ en dichos tiempos.

3.5 Determinación de clorofilas y carotenoides

Para llevar a cabo el análisis de clorofilas y carotenoides de *Tetraselmis suecica*, se centrifuga un volumen que contenga 1×10^6 de células durante 15 minutos en una centrifuga *Multifuge 3L-R Heraeus* a 4500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Acto seguido, se resuspende el precipitado en acetona: metanol (2:1). Se somete a ultrasonidos cada muestra durante 30 segundos para favorecer la ruptura celular y la consiguiente extracción de la clorofila. Se centrifuga nuevamente y se mide el sobrenadante en el espectrofotómetro para la cuantificación de los pigmentos. Una vez obtenidas las

absorbancias se halla la cantidad de clorofila *a* y carotenoides usando para ello la siguiente ecuación (Jeffrey and Humphrey, 1975):

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

$$\text{Carotenoides} = 4 A_{480}$$

Donde las concentraciones se expresan en $\mu\text{g/ml}$, y A_{664} , A_{647} y A_{480} representan las absorbancias medidas a 664, 647 y 480nm respectivamente.

3.6 Análisis de la actividad celular

Se calcula la actividad celular mediante un análisis de la degradación de diacetato de fluoresceína (FDA). Dicha molécula es apolar, lipofílica y no fluorescente. Puede atravesar fácilmente las membranas plasmáticas. En células viables con actividad metabólica, las esterasas rompen enlaces éster que unen los dos residuos de acetato a la fluoresceína. Al romper estos enlaces, se libera la molécula de fluoresceína (polar, hidrofílica y altamente fluorescente) (Jones and Senft, 1985).

La ausencia de emisión de fluoresceína libre en las células viables con membrana celular intacta indicaría los efectos tóxicos sobre la actividad de las esterasas, que son enzimas esenciales para el funcionamiento normal de la célula (Jochem, 2000). De esta forma, analizando las diferencias de concentración de fluoresceína de las células metabólicamente activas, podremos detectar posibles alteraciones en la actividad celular.

Para medir la concentración de fluoresceína se centrifuga un volumen que contenga 1×10^6 células durante 20 minutos y se resuspende en 4 ml de agua de mar. A continuación, se añade 20 μl de FDA en todos los tubos. Finalmente, se añaden 8 ml de acetona, se somete a ruptura por ultrasonidos durante 1 min, se centrifuga y se miden las absorbancias en el espectrofotómetro *Shimadzu UV-160A*. La concentración de fluoresceína se calcula a partir la siguiente recta de calibrado, realizada con concentraciones de fluoresceína de 0.5, 1, 2, 4, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ a partir de la solución stock de fluoresceína 2mg/ml:

$$[\text{Fluoresceína}] \mu\text{g/ml} = 4.719 A_{490} + 0.0839$$

3.7 Análisis de la peroxidación lipídica

La cuantificación de la peroxidación lipídica es esencial para monitorizar el estrés oxidativo en multitud de procesos. El malonaldehído (MDA) es un buen marcador *in vitro* de peroxidación lipídica, ya que se forma durante este proceso junto con el 4-hidroxinonenal (4-HNE). La medida de estos productos terminales de la peroxidación lipídica es uno de los ensayos más aceptados para determinar el daño oxidativo. El MDA reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para generar un aducto MDA-TBA que es fácilmente cuantificado colorimétricamente ($\lambda = 532 \text{ nm}$).

Para el análisis de la peroxidación lipídica se recogen por centrifugación 2×10^6 células. A continuación, se resuspenden en 1 ml de TCA (ácido tricloroacético) 0.67% w/v y se

somete a ultrasonidos durante 2 minutos. Al homogenizado se le añade 300 μl de 0,5 TBA en 20% TCA. Se calienta la mezcla a 95°C durante 30 minutos y a continuación se enfría en hielo durante 10 minutos. Se centrifuga 20 minutos a 13000 rpm y se mide la absorbancia del sobrenadante a 532nm/600nm.

Se calcula la cantidad de malonaldehído formado (MDA) según la siguiente fórmula:

$$\text{MDA } \mu\text{mol/ml} = \text{DO}_{532-600} / 155$$

$155 \text{Mm}^{-1} \text{cm}^{-1} = \epsilon =$ coeficiente de extinción molar

3.8 Diseño experimental

Para evaluar los efectos tóxicos del triclosán sobre la microalga *Tetraselmis suecica* se preparan cultivos experimentales usando dos temperaturas (18°C y 22°C) y dos tratamientos distintos: un tratamiento control (cultivo libre de contaminante, en el que se le añade 150 μl de metanol, (ya que es la máxima cantidad de solvente que se ha utilizado) y otro con una cantidad de 1.6 mg/l de triclosán. Se realizan 3 réplicas de cada tratamiento y se monitorea el ensayo durante un periodo de 72 h de exposición en las mismas condiciones ambientales indicadas anteriormente.

Los cultivos se inician a partir de un inóculo en fase exponencial de crecimiento y se realizan en tubos *Kimax* con 45 ml de cultivo.

En el caso concreto del análisis de la actividad celular, se mide la cantidad inicial de fluoresceína a tiempo 0 y la producción final de la misma, tras incubar las muestras en un tiempo de 3 horas y protegidas de la luz.

3.9 Análisis estadístico

Para los distintos parámetros analizados se hallan las medias y los errores estándar de cada tratamiento y de los controles. Para la evaluación estadística se usa el programa *R commander* versión 3.3.1. En cada experiencia, la hipótesis de que el triclosán y la temperatura no afectan al parámetro de estudio se analiza mediante un análisis de la varianza con dos factores (ANOVA de dos factores). Se trabaja con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Todas las gráficas son realizadas con el programa Excel 2016.

4. Resultados y discusión

4.1 Crecimiento celular

El crecimiento celular de *Tetraselmis suecica* se ve influenciado por la presencia de triclosán, tal y como se observa en las curvas y tasas de crecimiento de la figura 3 y tabla 2. La temperatura, en cambio, no muestra diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

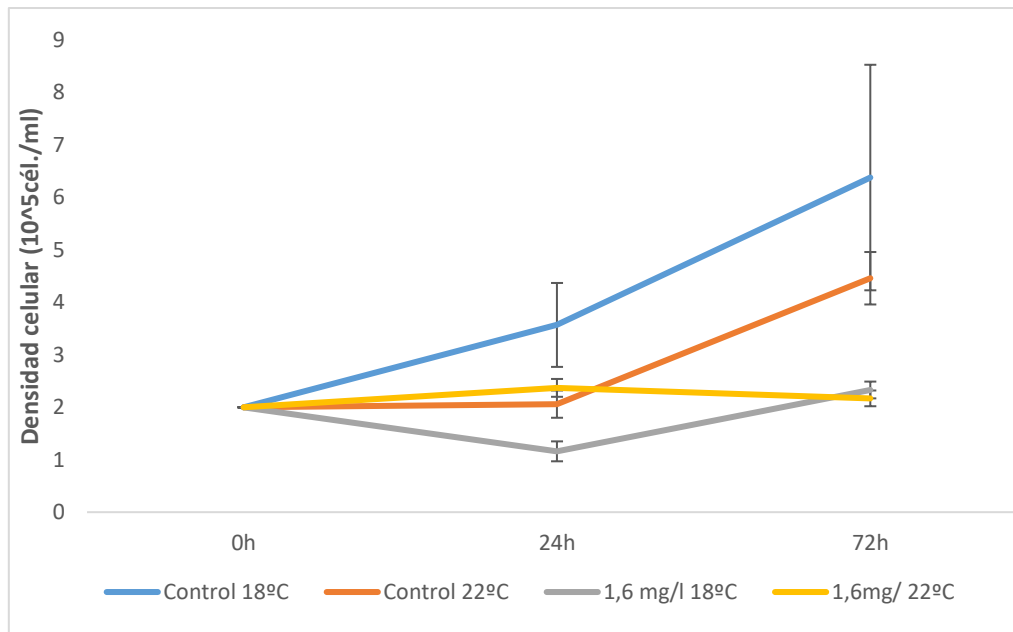


Figura 3: Crecimiento de *Tetraselmis suecica* cultivada en presencia de triclosán en el medio y a dos condiciones de temperatura.

Aunque a las 72 horas los resultados son más notorios, tanto a las 24 como a las 72 horas se puede observar el efecto negativo del triclosán en *T.suecica*, existiendo dos grupos claramente diferenciados. La densidad celular se vio afectada significativamente ($p < 0,05$) en las muestras expuestas a una concentración de 1.6 mg/L de triclosán, observándose una disminución en el crecimiento de la microalga (Fig. 3). La mayor densidad fue encontrada, tal y como cabría de esperar, en el tratamiento control a 18°C, seguida del control a 22°C. La menor densidad celular fue el tratado a 1.6 mg/ L 22°C (Tabla 1).

En cuanto a la temperatura, parece que un aumento de la misma hace disminuir la densidad celular, sin embargo, no se obtienen diferencias significativas, por lo que no podemos concluir que la temperatura afecte en la densidad de *T.suecica*. A las 24 horas de exposición, se obtienen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los cultivos control a 18°C y los tratados con 1.6 mg/L de triclosán a esa misma temperatura. En el caso concreto de los expuestos a 22°C no se obtiene un patrón claro, pareciendo incluso que las tratadas con 1.6 mg/ L tienen una mayor densidad celular que las no tratadas con triclosán (Fig. 3). Esto podría ser debido al estrés sufrido por la microalga ante una primera exposición al contaminante, respondiendo, en un primer momento, mediante un aumento de su densidad celular que podría explicarse como un intento de las células para adaptarse y así poder resistir los efectos negativos del triclosán (Tosello *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012). A las 72 horas ya no se observa este resultado, de forma que se muestra claramente que las microalgas expuestas a 1.6 mg/L de triclosán tienen una menor densidad celular que las muestras control (menos de la mitad).

Además, si tenemos en cuenta el afecto combinado de la temperatura y del triclosán, se puede observar que en los cultivos tratados con el contaminante parece que la temperatura potencia el efecto negativo del mismo, de forma que a 22°C la cantidad

de células/ml disminuye respecto a las encontradas a 18°C. Sin embargo, como dijimos con anterioridad, los resultados obtenidos referentes a la temperatura no son significativos ($p > 0,05$), por lo que no podemos rechazar la hipótesis de que la temperatura no afecte en el crecimiento de *Tetraselmis suecica*.

Tratamiento	Densidad celular (10^5 cél./ml)
Control 18°C	6,38 ± 2,15
Control 22°C	4,46 ± 0,50
1,6 mg/l 18°C	2,33 ± 0,16
1,6 mg/l 22°C	2,11 ± 0,15

Tabla 1: Densidades celulares expresadas en cél·ml⁻¹ tras la exposición de *T. suecica* a concentraciones de triclosán de 1,6 mg·ml⁻¹ , 0,1 mg·l⁻¹ a las 72h.

A las 24 horas, las mayores tasas de crecimiento fueron encontradas en el tratamiento control a 18°C. Sin embargo, a 22°C la tasa mayor fue la del tratamiento control a 18°C, y las menores encontradas fueron con triclosán a 22°C, mostrando un resultado negativo por decrecimiento celular ante la exposición del contaminante (Tabla 2).

Tratamiento	Tasas de crecimiento (día ⁻¹)	
	24h	72 h
Control 18°C	0,035 ± 0,01	0,035 ± 0,01
Control 22°C	0,002 ± 0,01	0,046 ± 0,01
1,6mg/l 18°C	-0,033 ± 0,01	0,042 ± 0,01
1,6 mg/l 22°C	0,010 ± 0,00	-0,007 ± 0,00

Tabla 2: Tasas de crecimiento de *T.suecica* expresada en día⁻¹ en los tratamientos control y a concentraciones de 1.6 mg/ L de triclosán. Los valores representan la media de las tres réplicas ± la desviación estándar.

Además de las microalgas, otros microorganismos se van a ver inhibidos en su crecimiento por la presencia de triclosán, siendo algunos de ellos patógenos como es el caso de la *Salmonella* (Tabak *et al.*, 2007), *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli* (Escalada *et al.*, 2005), parásitos como *Plasmodium falciparum* (McLeod *et al.*, 2001), entre otros.

El mecanismo de acción consiste en que la molécula del triclosán se une a la enzima ENR, que está codificada por el gen *FabI*. Esta unión aumenta la afinidad de la enzima NAD⁺, dando lugar a la formación de un complejo ternario estable de ENR-NAD⁺ que es incapaz de participar en la síntesis de ácidos grasos. Los seres humanos no tienen esta enzima ENR, y por lo tanto no se ven afectados por dicha toxicidad. (Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2017)

4.2 Clorofilas y carotenoides

La cantidad de clorofilas por célula disminuye en aquellas que son tratadas con triclosán, tanto en las 24 como en las 72 horas (Fig. 4). Los resultados muestran que existe interacción significativa ($p < 0,05$) entre el contaminante y la temperatura usada,

de forma que, cuando no existe triclosán en el medio, la célula aumenta su contenido en clorofila *a* a medida que aumenta la temperatura externa. Por otra parte, cuando en el medio está presente el contaminante, y se produce un aumento de temperatura, *T.suecica* responde de manera inversa, disminuyendo su contenido celular de clorofila *a*, potenciando así el efecto negativo sobre la microalga (Fig. 4). Estos efectos negativos del triclosán en la concentración de clorofila *a*, también fue encontrado en otras especies como *Scenedesmus vacuolatus* (Franz *et al.*, 2008).

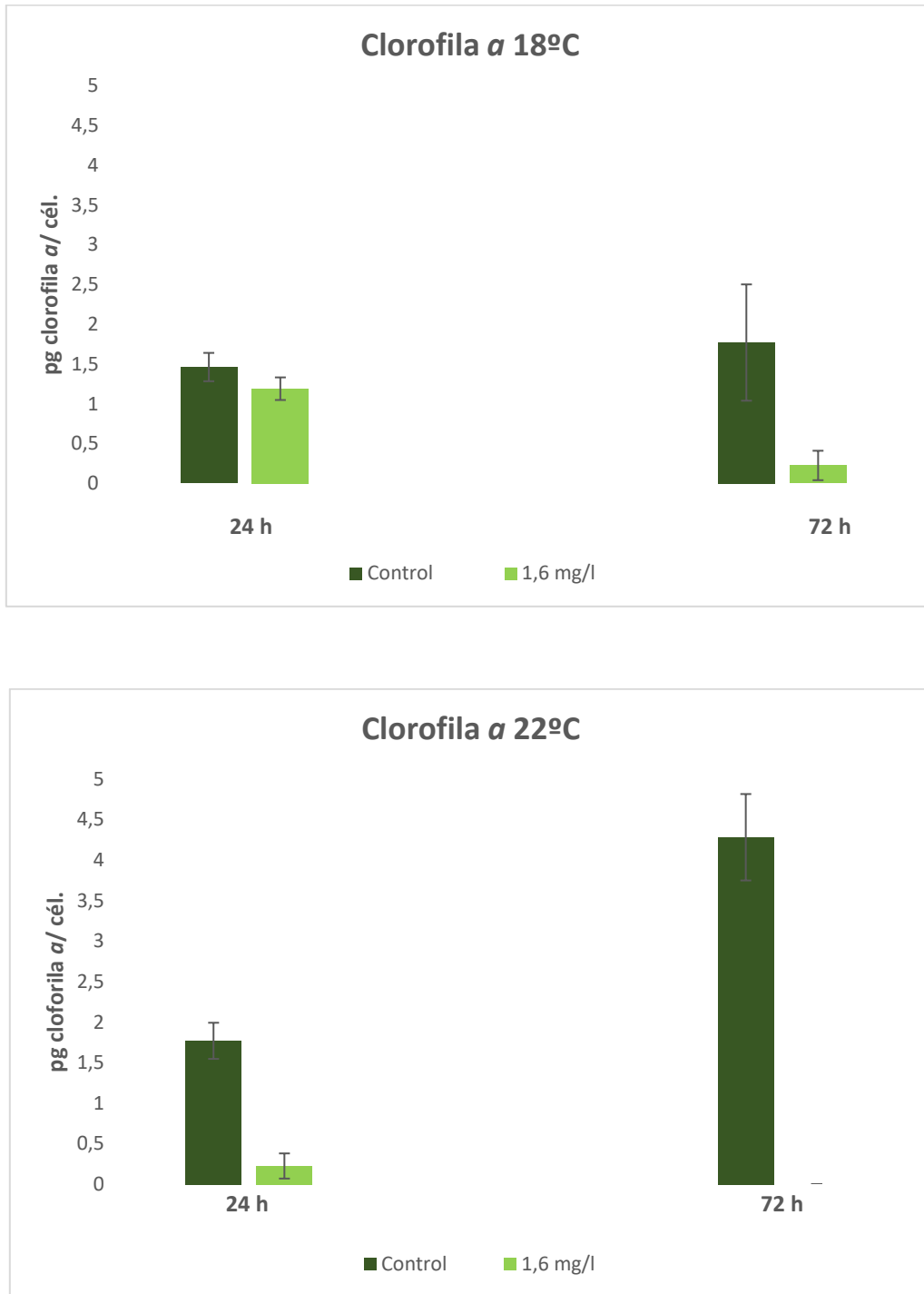


Figura 4: Concentración de clorofila *a* en *T. suecica* a 18°C y a 22°C ante una exposición de triclosán a 24 y a 72 horas.

Algunos autores señalaron que el estrés ambiental puede ser causa de esta disminución en la concentración de clorofila *a* (Hendry and Price., 1993). En otro caso, se demostró que algunos compuestos como el cloranfenicol, pueden inhibir fuertemente la síntesis de clorofila *a* (Banerji and Manmohan., 1966). Tsiaka *et al.* (2013) analizó el efecto de la carbamazepina en *Dunaliella tertiolecta*, mostrando una reducción significativa en el contenido en pigmentos fotosintéticos. Probablemente, la disminución del contenido celular de clorofila ante una exposición del contaminante se deba a la interferencia de éste en la síntesis de protoclorofila y la consecuente conversión a clorofila (Zhang *et al.*, 2012).

Por otra parte, un aumento de la temperatura puede causar una estimulación en el crecimiento de los organismos fotosintéticos que no se encuentran expuestos a los contaminantes (Davis *et al.*, 2009).

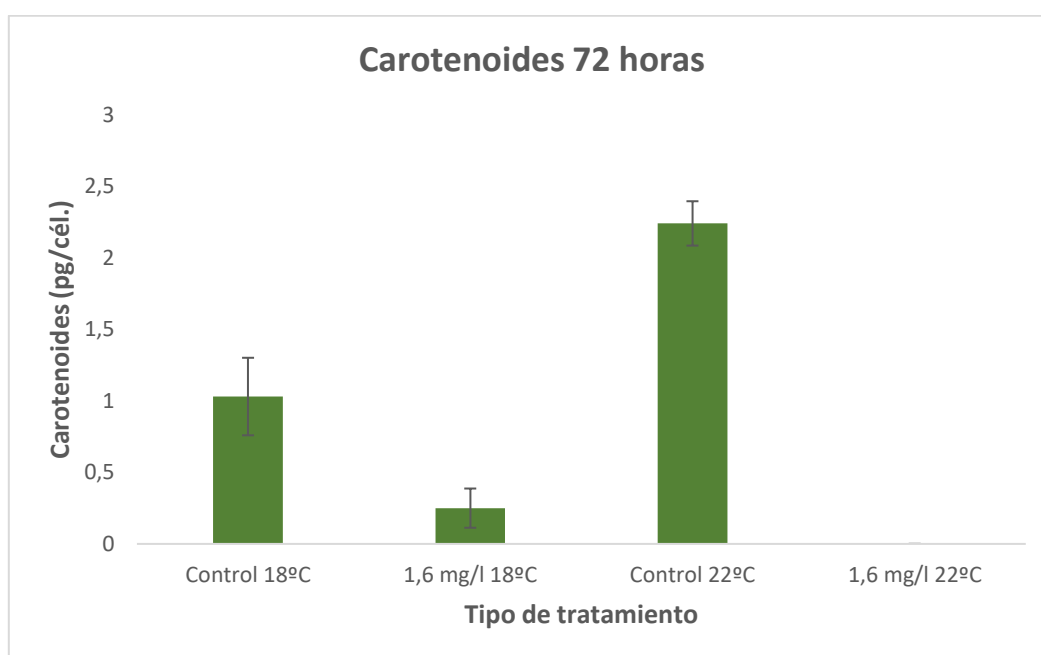


Figura 5: Concentración celular de carotenoides a las 72 horas.

En el caso de los carotenoides, sólo hemos obtenido concentraciones detectables a partir de las 72 horas (Fig. 5). La figura 5 nos muestra como la concentración de carotenoides aumenta con la temperatura en las muestras control, mientras que en las muestras tratadas con triclosán van a tener un efecto inverso, disminuyendo así la concentración de carotenoides con el aumento de la temperatura, igual que en el caso anterior. Los resultados obtenidos muestran que hay interacción entre la temperatura y el tipo de tratamiento, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$). De esta forma, e triclosán como la temperatura van a influir en la concentración final de carotenoides en *T.suecica*.

4.3 Actividad celular

La medición de la actividad esterasa es un mecanismo muy útil para medir la actividad celular de un gran número de células (Berglund and Eversman, 1988, Kaprelyants and

Kell, 1992; Humphreys *et al.*, 1994). Esta actividad está relacionada con la actividad metabólica de las células (Dorsey *et al.*, 1989) de modo que resulta una medición muy eficaz cuando queremos cuantificar respuestas ante un determinado estrés ambiental (Prado *et al.*, 2009).

En este ensayo, se demostró que la actividad celular de *Tetraselmis suecica* se ve afectada en presencia de triclosán, pero la temperatura no mostró diferencias significativas (Fig. 6)

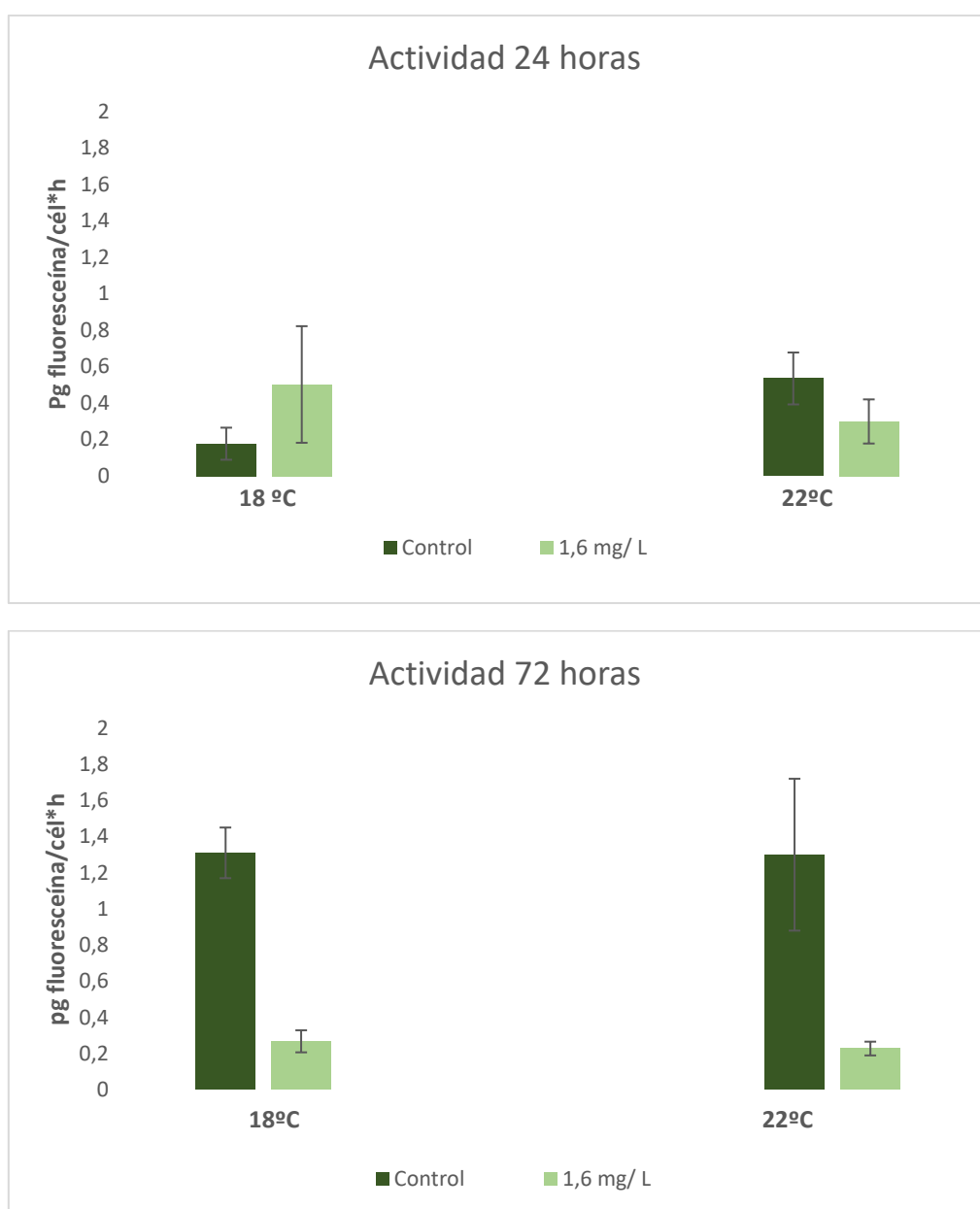


Figura 6: Efecto del triclosán y de la temperatura en la actividad metabólica de *T.suecica* a 24 y a 72 horas expresadas como pg de fluoresceína/cél*h.

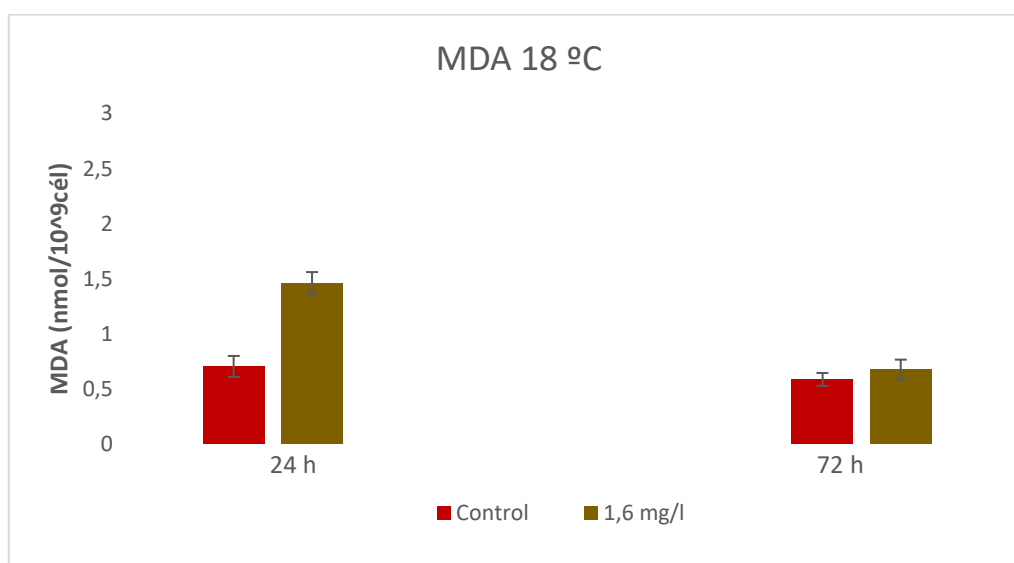
A las 24 horas de exposición a 18°C la concentración de fluoresceína en *Tetraselmis suecica* expuesta a 1,6 mg/ L de triclosán, aumenta con respecto al control a esa misma temperatura. Como ya se dijo anteriormente, esto puede ser debido al estrés

que sufre la microalga ante una primera exposición al contaminante, respondiendo en un primer momento mediante un aumento, en este caso, en la concentración de fluoresceína, que podría explicarse como un intento de las células para poder resistir los efectos negativos del triclosán (Tosello *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012). A las 72 horas, el efecto que tiene el triclosán sobre la microalga es mucho más notorio, obteniendo una reducción estadísticamente significativa de la fluoresceína ($p < 0,05$). Sin embargo, en este caso, para la temperatura no se han encontrado diferencias significativas por lo que parece no afectar en la concentración final de fluoresceína en las células.

En otros estudios, llevados a cabo con bajas concentraciones de otros contaminantes como el cobre o el herbicida paraquat (Frankin *et al.*, 2001; Prado *et al.*, 2009), se ha visto que se producía una estimulación de la actividad esterasa celular. Esto puede ser debido a que fueran estimuladas con el fin de repararlas debido al aumento de la peroxidación lipídica en la membrana por presencia de estos tóxicos. En nuestro caso, a las 72 horas de exposición, la peroxidación lipídica no nos dio resultados estadísticamente significativos, tal y como se explica en el siguiente apartado, por lo que no se produce esta estimulación.

4.4 Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica produce la degradación de los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares, pudiendo llegar a ocasionar la pérdida de viabilidad celular (Kappus and Sies, 1981). Para llevar a cabo este análisis se mide la concentración de malondialdehído (MDA), uno de los productos finales de la peroxidación lipídica y de la síntesis de prostaglandinas, caracterizándose por ser un compuesto mutagénico y carcinógeno. El MDA reacciona con la deoxiadenosina y la deoxiguanosina del DNA, formando aductos de DNA (Marnett, 1999). De esta forma, la detección de MDA es un indicador de radicales libres y, por lo tanto, de producción consecuente de daño tisular (Ohkawa *et al.*, 1979). Con este análisis se pretende cuantificar la concentración de MDA con la finalidad de evaluar si el triclosán interfiere en la peroxidación lipídica.



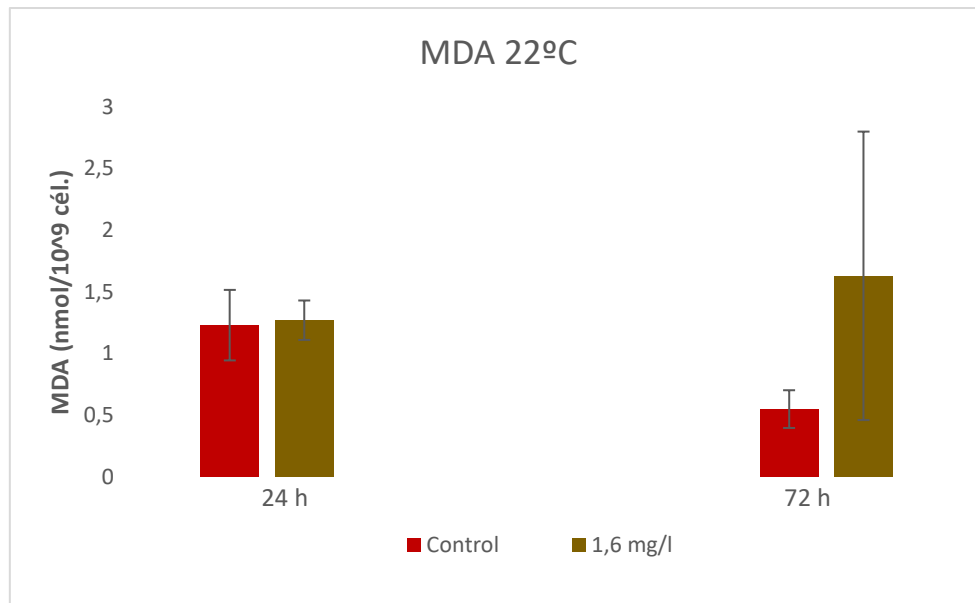


Figura 7: Efecto del triclosán y de la temperatura en la peroxidación lipídica de *Tetraselmis suecica*.

Sólo existen resultados significativos ($p < 0,05$) para el tratamiento a las 24 horas con 18°C. Para el resto de las muestras, aunque se puede observar un aumento en la concentración de MDA a las 72 horas en las células expuestas a triclosán y en las sometidas a 22°C, no se obtuvieron datos estadísticamente significativos. (Fig. 7)

En otros trabajos, también se observa esta tendencia a aumentar la concentración de MDA en aquellas células expuestas ante un estrés ambiental, como el efecto que mostraba el alga *Pseudokirchneriella subcapitata* ante una exposición de cobre y zinc. Con ambos contaminantes la microalga aumentaba la concentración celular de MDA, como era de esperar, debido al incremento de la peroxidación lipídica causada por los metales (Soto, Gaete and Hidalgo, 2011). En otro trabajo, se cuantificó el nivel de MDA en el tejido de los peces que estaban próximos a una refinería de petróleo en el río Kizilimark (Turquía). De esta forma, los peces que estaban en la zona baja de los ríos tenían mayores cantidades de MDA en sus tejidos musculares, debido a la acumulación de los contaminantes en estas zonas (Press, 2005).

En cuanto a la temperatura, son muchos los trabajos que se llevaron a cabo para analizar como influía este parámetro en la peroxidación lipídica celular. Concretamente, con *Phalaenopsis*, se llevó a cabo una cuantificación de los niveles de MDA entre un rango de 25 y 40 °C. Como era de esperar, se obtuvieron diferencias significativas, a partir de los 25° C, en las células de la hoja y de la raíz de la orquídea. (Ali *et al.*, 2005)

Debido a la exposición continua de este contaminante y a su potente bioacumulación, ya se han detectado pequeñas cantidades de triclosán en la leche materna, sangre y orina en humanos además de en numerosas especies acuáticas, siendo especialmente tóxico para las algas. Por si fuera poco, ejerce efectos negativos en el desarrollo de algunos peces al actuar como disruptor endocrino y, en el caso de algunos anfibios

como las ranas, cuando se encuentra en altas concentraciones, puede ejercer efectos adversos en la supervivencia, retrasando en desarrollo y el momento de su eclosión (Martins *et al.*, 2017). En un estudio más reciente, se descubrió el importante papel que tenía el calcio en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* como mediador en la respuesta del triclosán (González-Pleiter *et al.*, 2017). En dicho trabajo, se destacó también el fuerte impacto que tiene el triclosán en la microalga, induciendo una sobreproducción de ROS, que conduce en última instancia al estrés oxidativo con pérdida de la integridad de membrana, inhibición de la fotosíntesis, despolarización de la membrana mitocondrial y alteración de los genes metacaspasa que son indicativos de apoptosis. Pese a todo, se puede llegar a conseguir una eliminación parcial de este compuesto mediante el tratamiento de las aguas residuales, sin embargo algunos de los subproductos del originados como por ejemplo el metiltriclosán, pueden ser más resistentes a la degradación y ser más tóxicos que el producto original (Dann and Hontela, 2011).

Por otro lado, el aumento de temperatura puede potenciar alguno de los efectos nocivos del triclosán, tal y como se ve en el presente trabajo. Por lo que, la preocupación puede llegar a ser mayor, debido al aumento de la temperatura media del planeta por causa del cambio climático, provocado principalmente por las actividades antropogénicas. Debido a esto, resulta de vital importancia el uso controlado y limitado de este contaminante.

5. Conclusiones

El triclosán y el aumento de la temperatura ensayados en este trabajo provocan alteraciones significativas sobre la microalga marina *Tetraselmis suecica*, siendo el parámetro relacionado con la fotosíntesis (contenido en pigmentos) el más afectado.

Aunque la concentración de triclosán fue el parámetro más notorio en los resultados, provocando un descenso de la mayor parte de los parámetros analizados (crecimiento, contenido en pigmentos y actividad celular) con respecto al control después de 72 horas, el efecto combinado de éste y el aumento de la temperatura sólo mostró diferencias significativas en el contenido de clorofila *a* y de carotenoides, mostrando una disminución clara en el contenido celular de estos pigmentos. La peroxidación lipídica, aunque no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos, se observa un efecto contrario, es decir, se incrementa en las células expuestas a triclosán y con mayor temperatura.

Conclusións

O triclosán e o aumento da temperatura ensaiados neste traballo provocan alteracións significativas sobre a microalga mariña *Tetraselmis suecica*, sendo o parámetro relacionado coa fotosíntesis o máis afectado.

Aínda que a concentración de triclosán foi o parámetro máis notorio nos resultados, provocando un descenso da maior parte dos parámetros analizados (crecemento, contido en pigmentos e actividade celular) con respecto ao control despois de 72 horas, o efecto combinado de éste e o aumento da temperatura só mostrou diferenzas significativas no contido de clorofila *a* e de carotenoides, mostrando unha diminución clara no contido celular de estes pigmentos. A peroxidación lipídica, aínda que non se obtiveron resultados estadísticamente significativos, obsérvase un efecto contrario, é dicir, increméntase nas células expostas ao triclosán e coa maior temperatura.

Conclusions

The triclosan and the temperature increase tested in this work provoke significant alterations on the *Tetraselmis suecica* marine microalgae, being the parameter related to photosynthesis (pigment content) the most affected.

Although the concentration of triclosan was the most notorious parameter in the results, causing a decrease of most of the analyzed parameters (growth, pigment content and cellular activity) with respect to the control after 72 hours, the combined effect of this and the increase in temperature only showed significant differences in the chlorophyll *a* and carotenoid content, showing a clear decrease in the cellular content of these pigments. Lipid peroxidation, although no statistically significant

results were obtained, showed an opposite effect, that is, increased in the cells exposed to triclosan and with a higher temperature.

BIBLIOGRAFÍA

Ali, M.B., Hahn, E.J., Paek, K.Y., (2005) 'Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*'. Plant Physiol. Biochem. 43:213–223.

Allmyr, M., Adolfsson-Erici, M., McLachlan, M.S., Sandborgh-Englund, G.,/i. (2006) 'Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products', Science of the Total Environment, 372(1): 87–93.

Banerji, D., Manmohan, M.L. (1966) 'Chlorophyll formation in isolated pumpkin cotyledons in the presence of kinetin and chloramphenicol'. Plant Cell Physiol 8: 263-268.

Berglund, D.L. and Eversman, S. (1988). 'Flow cytometric measurements of pollutant stresses on algal cells. Cytometry 9: 150-155'.

Butcher, R.W. (1959). 'An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. Part I. Introduction and *Chlorophyceae*'. Fish In Min Fish Food 4: 71-74.

Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, M.P., Saoncella, A. (2001). ' An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments'. Water Res 35: 69-76.

Carballo-Cárdenas, E.C., Tuan, P.M., Janssen, M., Wijffels, R.H. (2003) 'Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation', Biomolecular Engineering, 20(4–6): 139–147.

Coogan, M.A., Edziyie, R.E., La Point, T.W., Venables, B.J. (2007) 'Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream', Chemosphere, 67(10):1911–1918.

Crain, C. M., Kroeker, K. and Halpern, B. S. (2008) 'Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems', Ecology Letters, 11(12), pp. 1304–1315.

Dann, A. B. and Hontela, A. (2011) 'Triclosan: Environmental exposure, toxicity and mechanisms of action', Journal of Applied Toxicology, 31(4), pp. 285–311.

Davis, T.W., Berry, D.L., Boyer, G.L., Gobler, C.J. (2009) 'The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of Microcystis during cyanobacteria blooms', Harmful Algae, 8(5): 715–725.

Dorsey, J., Yentsch, C.M., Mayo, S., McKenna, C. (1989). ' Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae. Cytometry 10: 135-156'.

Escalada, M.G., Harwood, J.L., Maillard, J.-Y., Ochs, D. (2005) 'Triclosan inhibition of fatty acid synthesis and its effect on growth of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.'. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 55(6): 879–882.

Esplugas, S., Bila, D.M., Krause, L.G.T., Dezotti, M. (2007) 'Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and

pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents', *Journal of Hazardous Materials*, 149(3):631–642.

Fabregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B., Veiga, M. (1984) 'Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations', *Aquaculture*, 42(3–4):207–215.

Fábregas, J., Otero, A., Domínguez, A., Patiño, M. (2001) 'Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species', *Marine Biotechnology*, 3(3):256–263.

Franz, S., Altenburger, R., Heilmeyer, H., Schmitt-jansen, M. (2008) 'What contributes to the sensitivity of microalgae to triclosan?', 90, pp. 102–108.

Franking, N.M., Stauber, J.L., Lim, R.P. (2001). 'Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters'. *Environ Toxicol Chem* 13:160-170.

González-Pleiter M, Rioboo C, Reguera M, Abreu I, Leganés F, Cid Á, Fernández-Piñas F. (2017)"Calcium mediates the cellular response of *Chlamydomonas reinhardtii* to the emerging aquatic pollutant Triclosan". *Aquat Toxicol*. 2017 May;186:50-66.

Hendry, G.A.F. and Price, A.H (1993). 'Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. En: *Methods in comparative plant ecology*'. Hendry, G.A.F. and Grime, J.P. (Ed). Chapman & Hall, Londres. pp.148-152.

Humphreys, M.J., Allman, R., Lloyd, D. (1994). 'Determination of the viability of *Trichomonas vaginalis* using flow cytometry'. *Cytometry* 15: 343-348.

Jeffrey, S. W. and Humphrey, G. F. (1975) 'New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton', *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, pp. 191–194.

Jochem, F.J. (2000). 'Proving the physiological state of phytoplankton at the single cell level. *Sci Mar* 34: 183-195.

Jones, K. H. and Senft, J. A. (1985) 'An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide.', *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 33(1):77–79.

Kappus, H. and Sies, H. (1981) 'Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation.', *Experientia*, 37(12): 1233–41.

Kaprelyants, A.S. and Kell, D.B. (1992). 'Rapid toxicity assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry'. *J APPL Bacteriol* 72: 410-422.

Lister, A.L., Van Der Kraak, G.J., (2001). 'Endocrine disruption: Why is it so complicated?' *Water Qual. Res. J. Canada* 36, 175–190.

Liu, W., Ming, Y., Huang, Z., Li, P.(2012). 'Impacts of florfenicol on marine diatom *Skeletonema costatum* through photosynthesis inhibition and oxidative damages'. *Plant Physiol Biochem* 60: 165-170.

Lürling, M. y Roessink, I. (2006). On the way to cyanobacterial blooms: impact of the

herbicide metribuzin on the competition between a green alga (*Scenedesmus*) and a cyanobacterium (*Mycrocystis*). *Chemosphere* 65: 618-626.

Marnett, L. J. (1999) 'Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde', *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1–2): 83–95.

Martins, D., Monteiro, M.S., Soares, A.M.V.M., Quintaneiro, C. (2017) 'Effects of 4-MBC and triclosan in embryos of the frog *Pelophylax perezi*', *Chemosphere*. Elsevier Ltd, 178, pp. 325–332.

McLeod, R., Muench, S.P., Rafferty, J.B., Kyle, D.E., Mui, E.J., Kirisits, M.J., Mack, D.G., Roberts, C.W., Samuel, B.U., Lyons, R.E., Dorris, M., Milhous, W.K., Rice, D.W. (2001) 'Triclosan inhibits the growth of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* by inhibition of apicomplexan Fab I', *International Journal for Parasitology*, 31(2):109–113.

Montes-Grajales, D., Fennix-Agudelo, M. and Miranda-Castro, W. (2017) 'Occurrence of personal care products as emerging chemicals of concern in water resources: A review', *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 595: 601–614.

Morineau-Thomas, O., Legentilhomme, P., Jaouen, P., Lepine, B., Rince, Y., (2001). 'Influence of a swirl motion on the interaction between microalgal cells and environmental medium during ultrafiltration of a culture of *Tetraselmis suecica*'. *Biotechnol. Lett.* 23, 1539–1545.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., (1979). 'Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction'. *Anal. Biochem.* 95: 351–358.

O'Neil MJ (2001). *The Merck Index — 'an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals'*. 13th Edition. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co.

Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herero, C., Abalde, J., Cid, A. (2009). 'Comparision of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat'. *Environ Int* 35: 240-247.

Press, A. I. N. (2005) 'Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry', 60: 101–105.

Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. (2017). triclosan | C12H7Cl3O2 - PubChem. [online] Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5564#section=Methods-of-Manufacturing> [Accessed 6 May 2017].

Seoane, M., Esperanza, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Ángeles. (2017) 'Flow cytometric assay to assess short-term effects of personal care products on the marine microalga *Tetraselmis suecica*', *Chemosphere*, 171: 339–347.

Soto, P., Gaete, H. and Hidalgo, M. E. (2011) 'Assessment of catalase activity , lipid peroxidation , chlorophyll- a , and growth rate in the freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to copper and zinc. Evaluación de la actividad de la catalasa , peroxidación lipídica , clorofila- a y tasa de crecimiento en la alga verde de agua dulce *Pseudokirchneriella subcapitata* expuesta a cobre y zinc', 39(2): 280–285.

- Tabak, M., Scher, K., Hartog, E., Romling, U., Matthews, K.R., Chikindas, M.L., Yaron, S. (2007) 'Effect of triclosan on *Salmonella typhimurium* at different growth stages and in biofilms', *FEMS Microbiology Letters*, 267(2): 200–206.
- Teo, C.L., Jamaluddin, H., Zain, N.A.M., Idris, A. (2014) 'Biodiesel production via lipase catalysed transesterification of microalgae lipids from *Tetraselmis sp.*', *Renewable Energy*. Elsevier Ltd, 68: 1–5.
- Tosello, M.E., Biasoli, M.s., Luque, A.G., Magaro, M.M. y Krapp, A.R. (2008). 'Oxidative stress response involving induction of protective enzymes in *Candida albicans*'. *Med Mycol* 45: 535.
- Tsiaka, P., Tsarpali, V., Ntaikou, I., Kostopoulou, M.N., Lyberatos, G., Dailianis, S. (2013). 'Carbamazepine- mediated pro-oxidant effects on the unicelular marine algal species *Dunaliella tertiolecta* and the hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*'. *Ecotoxicology* 22: 1208-1220.
- Veldhoen, N., Skirrow, R.C., Osachoff, H., Wigmore, H., Clapson, D.J., Gunderson, M.P., Van Aggelen, G., Helbing, C.C. (2007) 'Corrigendum to "The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anurandevlopment"[*Aquat.Toxicol.*80(2006)217-227]', *Aquatic Toxicology*, 83(1): 84.
- Wilson, B.A., Smith, V.H., Denoyelles, F., Larive, C.K. (2003) 'Effects of three pharmaceutical and personal care products on natural freshwater algal assemblages', *Environmental Science and Technology*, 37(9): 1713–1719.
- Yalkowsky, S.H., He, Yan, Jain, P. (2010). *Handbook of Aqueous Solubility Data Second Edition*. CRC Press, Boca Raton, p. 844.
- Zhang, W., Zhang, M., Lin., Sun, W., Xiong, B., Guo M., Cui, X., Fu,R. (2012) 'Eco-toxicological effect of Carbamazepine on *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*'. *Environ Toxicol Pharmacol* 33: 344-352.
- Schweizer, H.P.,(2001). Triclosan: 'A widely used biocide and its link to antibiotics'. *FEMS Microbiol. Lett.* 202: 1–7.