

# Efecto de azitromicina sobre el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*

## Effect of azithromycin on the growth of *Chlorella sorokiniana*

Yariela Núñez-Salazar<sup>1</sup>, Karina Rodríguez-Mora<sup>2</sup>,  
Eddy Jirón-García<sup>3</sup>, Fabián Villalta-Romero<sup>4</sup>

Núñez-Salazar, Y; Rodríguez-Mora, K; Jirón-García, E; Villalta-Romero, F. Efecto de azitromicina sobre el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 69-78.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7610>

1 Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, Sede Caribe, Costa Rica.

 [yari8952@gmail.com](mailto:yari8952@gmail.com)

 <https://orcid.org/0000-0002-0030-5109>

2 Unidad de Recursos Forestales, Instituto de Investigaciones en Ingeniería, Universidad de Costa Rica. Costa Rica.

 [karina.rodriguez mora@ucr.ac.cr](mailto:karina.rodriguez mora@ucr.ac.cr)

 <https://orcid.org/0000-0001-9660-4623>

3 Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, Sede Caribe. Costa Rica.

 [eddy.jiron@ucr.ac.cr](mailto:eddy.jiron@ucr.ac.cr)

 <https://orcid.org/0000-0002-7524-9033>

4 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 [fvillalta@itcr.ac.cr](mailto:fvillalta@itcr.ac.cr)

 <https://orcid.org/0000-0001-7484-8125>

## Palabras clave

Biotecnología; cinética; microalga; microorganismo; antibióticos.

## Resumen

Mediante cultivos mixotróficos se analizó el efecto de la Azitromicina como contaminante en el medio de cultivo, para esto, se evaluó la cinética de crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana*. Se evaluaron tres concentraciones de azitromicina en el medio de cultivo: 10, 15 y 25 ppm. Para la evaluación de la cinética se calculó la tasa de crecimiento exponencial, tiempo de duplicación y tasas de rendimiento. Aunque la viabilidad de *Chlorella sorokiniana* fue significativamente reducida por la presencia de azitromicina, esta microalga logró crecer hasta por 18 días en concentraciones de azitromicina (< 25 ppm) superiores a las reportadas en plantas de tratamiento de aguas, lo cual demuestra su potencial para ser empleada en estrategias de biorremediación de este antibiótico. Hasta donde es de nuestro conocimiento, este es el primer reporte de la cinética de crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en concentraciones de azitromicina de 10 a 25 ppm.

## Keywords

Kinetics, microalgae, microorganism, antibiotics, biotechnology.

## Abstract

By employing mixotrophic cultures, the effect of Azithromycin as a contaminant in the culture medium was analyzed, evaluating the growth kinetics of the microalga *Chlorella sorokiniana*. Three concentrations of azithromycin were evaluated in the culture medium: 10, 15, and 25 ppm. Growth kinetics were assessed by calculating the exponential growth rate, doubling time, and yield rates. Although the viability of *Chlorella sorokiniana* was significantly reduced by the presence of azithromycin, this microalga managed to grow for up to 18 days in azithromycin concentrations (< 25 ppm) higher than those reported in water treatment plants, which demonstrates its potential to be used in bioremediation strategies. To the best of our knowledge, this is the first report of the growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* at azithromycin concentrations of 10 to 25 ppm.

## Introducción

La microalga *Chlorella sorokiniana* es un alga verde de agua dulce, de la familia de las *Chlorophyta* [1]. El género *Chlorella* es cosmopolita, por lo tanto, es capaz de adaptarse a diversas condiciones ambientales y nutricionales [1], [2]; además, se caracteriza por poseer células esféricas, con un cloroplasto en forma de copa y pirenoide [3].

*C. sorokiniana* puede desarrollarse en condiciones heterotróficas, fototróficas y mixotróficas; estas últimas involucran dos procesos simultáneamente, la fotosíntesis (fijación del CO<sub>2</sub> inorgánico) y la fosforilación oxidativa, en donde se da la asimilación del carbono orgánico [4], [5]. Esto le permite a *C. sorokiniana* ser una alternativa prometedora dentro de las microalgas, ya que puede aprovechar simultáneamente el CO<sub>2</sub> y otras fuentes de carbono orgánico como acetatos, glicerol o azúcares [6].

Las aguas residuales son una fuente de carbono abundante y económica que se puede utilizar como medio para el cultivo de microalgas, con el beneficio asociado de que estos microorganismos pueden ayudar en la remediación de efluentes y el secuestro de CO<sub>2</sub> [7]. Además de lograr la biodegradación de contaminantes, el cultivo de microalgas utilizando aguas residuales permite también producción de biomasa para otros usos [8].

Las microalgas también pueden utilizar los antibióticos como fuentes de carbono y energía [9], y pueden realizar la descomposición de antibióticos mediante distintos procesos, tales como la biodegradación. Este proceso puede describirse como una catálisis enzimática de dos fases; en la primera etapa, los antibióticos son metabolizados en compuestos más hidrofílicos; en la segunda fase, estos compuestos pueden ser catalizados por otro grupo de enzimas para producir moléculas más pequeñas con distintos efectos biológicos [9], [10].

La azitromicina es un antibiótico ampliamente utilizado en infecciones del tracto respiratorio, oídos y transmisión sexual; debido a sus aplicaciones variadas y a un mal manejo de los desechos médicos, se ha reportado la presencia de azitromicina en plantas de tratamiento de agua residual (PTAR), alcantarillados y en otros cuerpos de agua [11], [12], [13], [14]. En América Latina, la azitromicina se ha identificado como un contaminante emergente en aguas residuales, donde se cuantificó con una concentración de 6000 a 11000 ngL<sup>-1</sup> [15].

En Costa Rica, el Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología (CIMAR) de la Universidad de Costa Rica (UCR), tras realizar un estudio en muestras de agua superficial de 86 cantones a nivel nacional, detectó la presencia de antibióticos macrólidos, grupo al que pertenece la azitromicina [16]. Además, según el Centro de Investigaciones en Contaminación Ambiental (CICA) de la UCR, en 2020 se determinó que la azitromicina era uno de los contaminantes mayoritarios en los efluentes tomados en 11 regiones alrededor del país [17].

La azitromicina puede tener un efecto dual en el crecimiento de las microalgas. En *Chlorella pyrenoidosa*, concentraciones de azitromicina de 0.005 a 0.1 ppm inhibieron el crecimiento, pero lo aumentaron a 0.0005 y 0.001 ppm [18]. Por su parte, en *Chlorella vulgaris* la azitromicina mostró alta toxicidad desde concentraciones desde 0.35 ppm, aunque esta microalga logró biodegradar hasta el 100% de la azitromicina [19].

Tomando lo anterior en consideración, debido a que la microalga *Chlorella sorokiniana* posee una gran adaptabilidad en su crecimiento, se evaluó la cinética de crecimiento de esta microalga en cultivos mixotróficos con diferentes concentraciones de azitromicina, con el fin de determinar la tolerancia de esta microalga a dicho antibiótico.

## Materiales y métodos

Reactivos y microalgas. Los materiales empleados fueron: agua destilada; medio de cultivo BG11, PhytoTechnology Laboratories [20]; azitromicina 96,6% pura (C<sub>38</sub>H<sub>72</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>·2H<sub>2</sub>O), grado analítico, CAS 117772-70-0, Sigma Aldrich; y metanol 99,5%, grado reactivo, CAS 67-56-1, Sigma Aldrich. La microalga *Chlorella sorokiniana* pertenece a la colección del Laboratorio de Microalgas del Centro de Investigación de Biotecnología del Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. No se realizaron accesiones bioquímicas ni genéticas al material biológico empleado en este estudio.

Cultivo de *Chlorella sorokiniana* utilizando azitromicina en el medio de cultivo. Se utilizó un inóculo inicial de 5.0 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup>. Se realizó una prueba preliminar a una temperatura de 25°C y 1135 Luxes en agitación por 72 h utilizando concentraciones de azitromicina de 25, 50, 75 y 100 ppm en el medio de cultivo ( $n = 3$ ), tomando como referencia el rango de concentraciones propuesto por El-Yazbi *et al.* [21]. Con los resultados obtenidos, se realizaron curvas de crecimiento de la microalga en las mismas condiciones durante 18 días, con

concentraciones de azitromicina de 0 (control), 10, 15 y 25 ppm ( $n = 3$ ), y manteniendo un flujo de aire en los matraces de manera constante. Por otra parte, se realizó un punto de comparación máxima entre tratamientos al día 14, con el fin de analizar la productividad en relación con la concentración de azitromicina.

Quantificación del crecimiento microalgal y la viabilidad. En cada iteración experimental se extrajo 1 mL de muestra diariamente durante el período de cultivo, donde se determinó la concentración celular y la viabilidad celular con el citómetro de flujo Muse Cell Analyzer para cuantificar la proporción de células vivas y muertas presentes en el cultivo. Este análisis se realizó mediante el protocolo de ensayos denominado "Muse Algae Count & Viability Kit" según las recomendaciones del fabricante (Luminex Corporation).

Análisis de la cinética de crecimiento microalgal. Primeramente, se analizó el comportamiento de la concentración celular con respecto al tiempo, para así definir la fase exponencial, ya que la tasa de crecimiento específico de células por unidad de tiempo ( $r$ ) es proporcional al número de células presentes en el cultivo ( $N$ ) en un intervalo de tiempo ( $t$ ) [20]. Siguiendo las ecuaciones propuestas por [20], se tiene:

$$\frac{dn}{dt} = r \cdot N$$

Donde la solución corresponde a:

$$N_t = N_0 \cdot e^{rt}$$

Despejando la ecuación para  $r$ , se tiene:

$$r = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\Delta t}$$

Cuando el tiempo ( $t$ ) se expresa en días, la tasa de crecimiento específico puede ser expresada en términos de duplicaciones por día ( $k$ ), de la siguiente forma:

$$k = \frac{r}{\ln(2)}$$

El tiempo de duplicación ( $T_2$ ), para el cultivo, expresado en las mismas unidades de tiempo que  $r$ , se puede calcular a partir de una estimación de  $r$  con el uso de la ecuación:

$$T_2 = \frac{\ln(2)}{r}$$

La tasa de rendimiento ( $Y$ ) del cultivo, se determinó calculando la diferencia entre la concentración del inóculo inicial y la concentración después de algún intervalo de crecimiento, dividido entre este mismo intervalo de tiempo:

$$Y = \frac{N_t - N_0}{\Delta t}$$

Análisis estadístico. Se utilizó un diseño de ANOVA de un factor con un 95% de confiabilidad para determinar el efecto de la dosis de azitromicina en el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*. Se evaluaron las variaciones en la concentración utilizando diferentes dosis de azitromicina, con tres réplicas por tratamiento. El análisis estadístico se realizó con el software STATGRAPHICS Centurion versión XIX, utilizando el método ANOVA de un solo factor. Se establecieron diferencias estadísticas a un nivel de confianza del 95,0% mediante el método de la diferencia menos significativa (LSD) de Fisher para evaluar el efecto de la concentración de azitromicina en

la concentración celular, con las barras de desviación estándar en las gráficas representando el error para cada tratamiento. Se determinó el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) de las curvas de crecimiento de microalga en presencia de diferentes concentraciones de azitromicina, para ello se utilizó el programa Graph Pad Prism (versión 10.2 para Windows, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA).

## Resultados y discusión

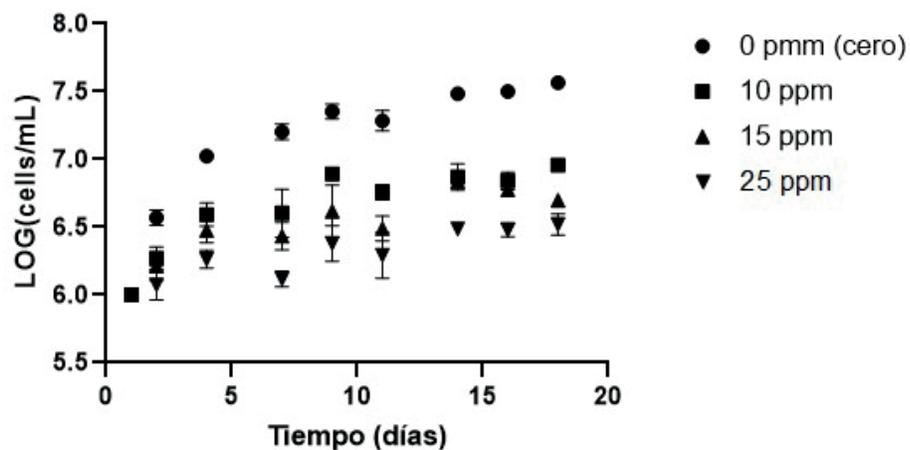
Con el fin de determinar un rango de concentración para la evaluación de la microalga, se evaluó primero el porcentaje de viabilidad de *Chlorella sorokiniana* en presencia de azitromicina en un rango de 25 a 75 ppm (Cuadro 1). A una concentración de 50 ppm la viabilidad se redujo hasta un 58.8%; por lo cual, se decidió realizar las evaluaciones posteriores en un rango de trabajo de 10 a 25 ppm de azitromicina.

**Cuadro 1.** Porcentaje de células viables de la microalga *Chlorella sorokiniana* luego de cultivo durante 72 horas empleando diferentes concentraciones de azitromicina.

Concentración de azitromicina (ppm)	Concentración de algas vivas (células mL <sup>-1</sup> )	Concentración de algas muertas (células mL <sup>-1</sup> )	Porcentaje de viabilidad (%)
25	4.12 x 10 <sup>6</sup>	7.50 x 10 <sup>5</sup>	84.6
50	2.28 x 10 <sup>6</sup>	1.60 x 10 <sup>6</sup>	58.8
75	5.00 x 10 <sup>4</sup>	2.53 x 10 <sup>6</sup>	1.9
100	0.00 x 10 <sup>0</sup>	1.72 x 10 <sup>6</sup>	0

Al evaluar la curva de crecimiento de *C. sorokiniana* en medios de cultivo con concentraciones crecientes de azitromicina, se observó la ausencia de la etapa de latencia en todos los tratamientos, ya que se observa un crecimiento exponencial desde los primeros días de cultivo (Figura 1). Por otra parte, se muestra una disminución de la concentración de microalgas con respecto al control, esta diferencia aumenta de manera proporcional a la concentración de azitromicina. Esto se comprobó mediante el análisis del área bajo la curva (AUC), donde se observó que al aumentar la concentración de azitromicina disminuyó el valor del área con respecto al control (Cuadro 2). Además, a los 14 días con 15 ppm de azitromicina se obtuvo la mayor concentración celular, por lo que esto se utilizó como punto de referencia para realizar las comparaciones de concentración máxima.

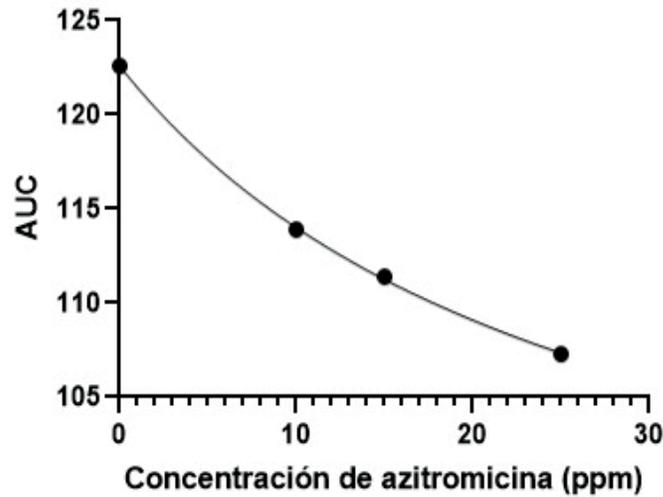
Por otra parte, se realizó un análisis de tendencia del área bajo la curva vs la concentración de azitromicina (Figura 2) mediante una regresión no lineal de modelo inhibidor vs respuesta ( $r^2 = 0.999$ ); donde se demuestra gráficamente que la concentración de microalgas disminuye de forma proporcional al aumentar la concentración de azitromicina en comparación con el control.



**Figura 1.** Curvas de crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en respuesta a diferentes concentraciones de azitromicina durante 18 días (promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n = 3$ ).

**Cuadro 2.** Análisis de correlación AUC de tiempo máximo vs LOG de concentración celular máxima de la microalga *Chlorella sorokiniana* al emplear diferentes dosis de azitromicina (promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n = 3$ ).

Concentración de azitromicina (ppm)	Área bajo la curva (AUC)	LOG concentración celular máxima (células mL <sup>-1</sup> )	Tiempo máximo (días)
0	122.6 $\pm$ 0.22	7.57	18
10	113.9 $\pm$ 0.44	6.96	18
15	111.4 $\pm$ 0.43	6.84	14
25	107.3 $\pm$ 0.43	6.52	18



**Figura 2.** Crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* (AUC) en respuesta a diferentes concentraciones de azitromicina en el medio de cultivo durante 18 días (promedio,  $n = 3$ ).

Con base en las curvas de crecimiento se calcularon los valores de tasa de crecimiento y duplicaciones por día (Cuadro 3). Al aumentar la concentración de azitromicina se redujo la tasa de crecimiento y las duplicaciones al día, demostrando con ello la sensibilidad de la microalga a los cambios de concentración del fármaco. Además, a los 14 días de comparación máxima, los resultados confirmaron que todos los tratamientos con azitromicina causaron concentraciones celulares significativamente reducidas respecto al control (Cuadro 4). Estos resultados muestran que *Chlorella sorokiniana* puede crecer a concentraciones de azitromicina superiores a las reportadas en plantas de tratamiento de aguas ( $2.8 \times 10^{-3}$  ppm) [10], por lo cual tendría potencial para tolerar estas concentraciones y ser empleada en estrategias de biorremediación.

**Cuadro 3.** Tasas de crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en medios de cultivo con diferentes concentraciones de azitromicina (promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n = 3$ ).

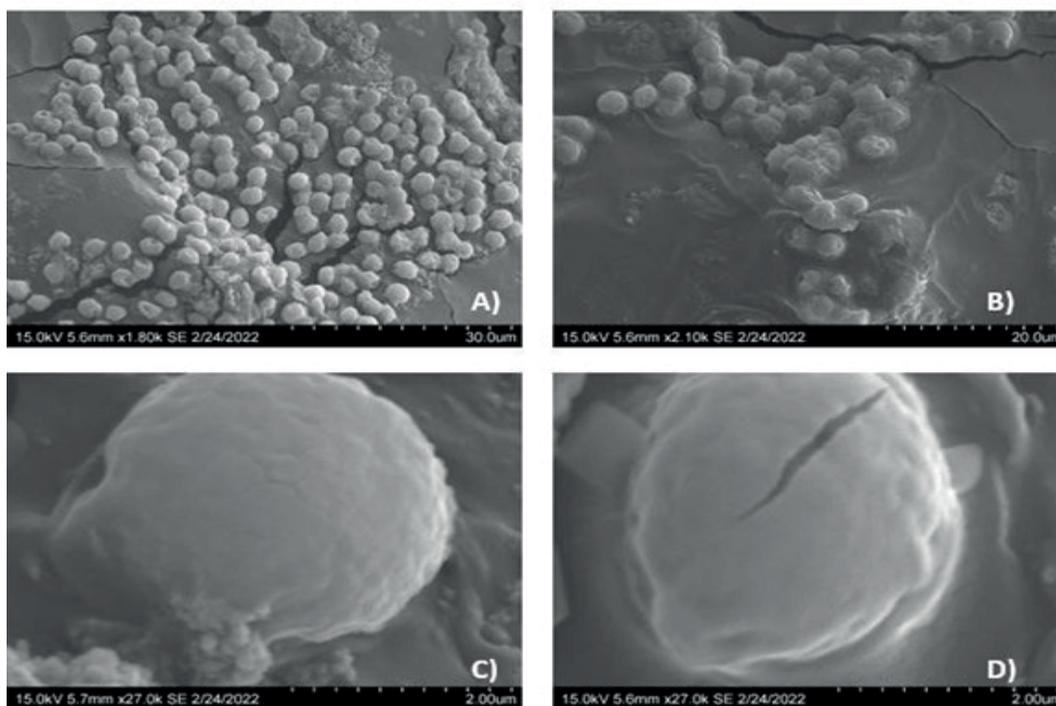
Concentración azitromicina (ppm)	Tasa de crecimiento exponencial $r$ (días <sup>-1</sup> )	Concentración celular en un intervalo de tiempo $N_t$ (células mL <sup>-1</sup> )	Duplicaciones por día (día)	Tiempo de duplicación $T_2$ (días <sup>-1</sup> )	Tasa de rendimiento $Y$ (células mL)/ (días)
0	$0.785 \pm 0.010$	$5.7732e^{0.0511 t}$ $r^2: 0.957$	$1.13 \pm 0.015$	$0.88 \pm 0.012$	$3.18 \times 10^6$
10	$0.458 \pm 0.021$	$5.8515e^{0.0307 t}$ $r^2: 0.976$	$0.66 \pm 0.031$	$1.51 \pm 0.085$	$9.9 \times 10^5$
15	$0.369 \pm 0.014$	$5.8782e^{0.0250 t}$ $r^2: 0.977$	$0.53 \pm 0.020$	$1.88 \pm 0.061$	$6.8 \times 10^5$
25	$0.205 \pm 0.024$	$5.9126e^{0.0145 t}$ $r^2: 0.999$	$0.30 \pm 0.035$	$3.38 \pm 0.493$	$2.8 \times 10^5$

**Cuadro 4.** Concentración celular (promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n = 3$ ) de *Chlorella sorokiniana* alcanzada en el día 14 a diferentes concentraciones de azitromicina. Las letras iguales, corresponden a grupos estadísticamente homogéneos según el método LSD de Fisher, con un nivel de confianza el 95%.

Concentración azitromicina (ppm)	Concentración celular promedio (células mL <sup>-1</sup> )	Viabilidad (% células vivas)	Tratamientos estadísticamente homogéneos
0	$3.04 \times 10^7 \pm 1.12 \times 10^6$	$98.04 \pm 0.29$	a
10	$7.58 \times 10^6 \pm 7.62 \times 10^5$	$94.46.67 \pm 2.01$	b
15	$6.87 \times 10^6 \pm 3.46 \times 10^5$	$91.67 \pm 1.19$	b
25	$3.07 \times 10^6 \pm 1.22 \times 10^5$	$85.82 \pm 0.66$	c

La comparación estadística entre los resultados de concentración celular alcanzados a los 14 días empleando las diferentes dosis de azitromicina (Cuadro 4) indican que no existe diferencia significativa al emplear 15 ppm o 25 ppm, pero estas dosis son significativamente diferentes a 10 ppm; por otra parte, todos los tratamientos empleando azitromicina son estadísticamente diferentes al control (Cuadro 4). Con esto se logra demostrar que la microalga *Chlorella sorokiniana* es capaz de crecer en concentraciones de azitromicina mayor a las reportadas anteriormente, potenciando así su aplicación en biorremediación.

Adicionalmente, se realizó microscopía electrónica de barrido (MEB) para verificar posibles daños estructurales inducidos por azitromicina en la microalga *Chlorella sorokiniana*. A una concentración de 10 ppm de azitromicina se observó que las microalgas sobrevivientes presentan una morfología muy similar a las microalgas no tratadas, conservando la forma esférica característica de la microalga (Figura 3).



**Figura 3.** Muestras de la microalga *Chlorella sorokiniana* en ausencia y presencia de azitromicina en una concentración de 10 ppm. A) muestra sin azitromicina (30.0  $\mu$ m); B) muestra con azitromicina (20.0  $\mu$ m); C) muestra sin azitromicina (2,0  $\mu$ m) y D) muestra con azitromicina (2,0  $\mu$ m).

## Conclusiones

Los resultados mostraron que, aunque la viabilidad de *Chlorella sorokiniana* fue significativamente reducida por la presencia de azitromicina, esta microalga puede crecer hasta por 18 días en concentraciones de azitromicina (< 25 ppm) superiores a las reportadas en plantas de tratamiento de aguas, lo cual demuestra su potencial para ser empleada en estrategias de biorremediación. Hasta donde es de nuestro conocimiento, este es el primer reporte de la cinética de crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en concentraciones de azitromicina de 10 a 25 ppm. En investigaciones futuras será necesario evaluar la concentración de azitromicina durante el tiempo de incubación con la microalga, con el fin de estudiar el metabolismo del antibiótico.

## Referencias

- [1] D. M. Ribeiro, L. F. Roncaratti, G. C. Possa, L. C. Garcia, L. J. Cançado, T. C. R. Williams y &. d. S. A. Figueiredo, "A low-cost approach for *Chlorella sorokiniana* production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers," *Bioresource Technology Reports*, vol. 9, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100354>
- [2] J. Wehr, R. Sheath, Kocielek y J. Patrick, "Freshwater Algae of North America: ecology and classification", Academic Press, Elsevier, 2014. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-66664-8>
- [3] Ortiz-Moreno Martha L., Cortés-Castillo Caroll E., Sánchez-Villarraga Julian, Padilla Jorge, Otero-Paternina Angélica M. Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas," *Universidad de los Llanos*, pp. 11-20, 2012. [Online] [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-37092012000100002&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-37092012000100002&lng=en).
- [4] L. Yu, T. Li, J. Ma, Q. Zhao, P. Wensel, J. Lian y S. Chen, "A kinetic model of heterotrophic and mixotrophic cultivation of the potential biofuel organism microalgae *Chlorella sorokiniana*," *Algal Research*, vol. 64, pp. 1-11, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102701>
- [5] A. León-Vaz, R. León, E. Díaz-Santos, J. Vigara y S. & Raposo, "Using agro-industrial wastes for mixotrophic growth and lipids production by the green microalga *Chlorella sorokiniana*," *New Biotechnology*, vol. 51, p. 31-38, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.02.001>
- [6] L. Leng, L. Wei, Q. Xiong, S. Xu, W. Li, S. Lv, Q. Lu, L. Wan, Z. Wen y W. & Zhou, "Use of microalgae based technology for the removal of antibiotics from wastewater: A review," *Chemosphere*, vol. 238, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124680>
- [7] Y. Chong, L. Chi, Z. Ying, D. Xiang, W. Jing-Han, C. Zhan-You y Z. Qian, "Effects of environment-relevant concentrations of antibiotics on seawater *Chlorella* sp. biofilm in artificial mariculture effluent," *Algal Research*, vol. 70, pp. 2211-9264, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103008>
- [8] A. Hom-Díaz, A. Jaén, S. Rodríguez, D. Barceló, T. Vicent y P. Blánquez, "Insights into removal of antibiotics by selected microalgae (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella sorokiniana*, *Dunaliella tertiolecta* and *Pseudokirchneriella subcapitata*)," *Algal Research*, vol. 61, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102560>
- [9] C. Kiki, A. Rashid, Y. Wang, Y. Li, Q. Zeng, C. P. Yu y Q. & Sun, "Dissipation of antibiotics by microalgae: Kinetics, identification of transformation products and pathways," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 387, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121985>
- [10] Li, Y., Ma, Y., Yang, L., Duan, S., Zhou, F., Chen, J., ... & Zhang, B, "Effects of azithromycin on feeding behavior and nutrition accumulation of *Daphnia magna* under the different exposure pathways," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 197, pp. 1-7, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110573>
- [11] S. Aydin, M. Emin Aydin, A. Ulvi y H. & Kilic, "Antibiotics in hospital effluents: occurrence, contribution to urban wastewater, removal in a wastewater treatment plant, and environmental risk assessment," *Environ Sci Pollut Res*, vol. 26, p. 544-558, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3563-0>
- [12] Collado, N., Rodriguez-Mozaz, S., Gros, M., Rubirola, A., Barceló, D., Comas, J., ... & Buttiglieri, G., "Pharmaceuticals occurrence in a WWTP with significant industrial contribution and its input into the river system," *Environmental Pollution*, pp. 202- 212, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.040>
- [13] C. E. Santos, R. N. de Coimbra, S. P. Bermejo, A. I. G. Pérez, and M. O. Cabero, "Comparative Assessment of Pharmaceutical Removal from Wastewater by the Microalgae *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*," *Biological Wastewater Treatment and Resource Recovery*". InTech, Mar. 29, 2017. <https://doi.org/10.5772/66772>.

- [14] Senta, I., Kostanjevecki, P., Krizman-Matasic, I., Terzic, S., & Ahel, M., "Occurrence and behavior of macrolide antibiotics in municipal wastewater treatment: possible importance of metabolites, synthesis byproducts, and transformation products," *Environmental Science and Technology*, vol. 53, pp. 7463-7472, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01420>
- [15] Peña-Guzmán, C., Ulloa-Sánchez, S., Mora, K., Helena-Bustos, R., Lopez-Barrera, E., Alvarez, J., & Rodríguez-Pinzón, M., "Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature". *Journal of Environmental Management*, 237, 408–423 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.100>
- [16] Spongberg, A. L., Witter, J. D., Acuña, J., Vargas, J., Murillo, M., Umaña, G., ... & Perez, G., "Reconnaissance of selected PPCP compounds in Costa Rican surface waters," *Water research*, 45(20), 6709-6717, 2011 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.004>
- [17] Ramírez-Morales, D., Masís-Mora, M., Montiel-Mora, J. R., Cambronero-Heinrichs, J. C., "Briceño-Guevara, S., Rojas-Sánchez, C. E., ... & Rodríguez-Rodríguez, C. E., "Occurrence of pharmaceuticals, hazard assessment and ecotoxicological evaluation of wastewater treatment plants in Costa Rica," *Science of The Total Environment*, vol. 746, p. 141200, Dec. 2020,. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141200>
- [18] Mao, Y., Yu, Y., Ma, Z., Li, H., Yu, W., Cao, L., & He, Q. "Azithromycin induces dual effects on microalgae: Roles of photosynthetic damage and oxidative stress," *Ecotoxicology and environmental safety*, 222, 112496. 2021 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112496>.
- [19] Kiki, C., Rashid, A., Zhang, Y., Li, X., Chen, T. Y., Adéoye, A. B. E., ... & Sun, Q. "Microalgal mediated antibiotic co-metabolism: Kinetics, transformation products and pathways," *Chemosphere*, 292, 133438, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133438>
- [20] Stein-Taylor, J. R. , "Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements.," *Cambridge University Press*, pp. 289–312., 1973.
- [21] A. F. El-Yazbi, E. F. Khamis, R. M. Youssef, M. A. El-Sayed y F. M. & Aboukhalil, "Green analytical methods for simultaneous determination of compounds having relatively disparate absorbance; application to antibiotic formulation of azithromycin and levofloxacin," *Heliyon*, vol. 6, n° 9, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04819>