

Toxicidad ejercida por contaminantes acuáticos sobre microalgas de agua dulce

Memoria presentada para optar al grado
de Doctor Internacional

Marta Esperanza Llera

**TESIS DOCTORAL UDC
2017**

Directores: Dra. Carmen Rioboo Blanco y Dr. Andrés Martínez Lage

Tutora: Dra. Ángeles Cid Blanco

Programa de Doctorado en Biología Celular y Molecular



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



**Toxicidad ejercida por contaminantes acuáticos sobre
microalgas de agua dulce**

**Toxicity exerted by aquatic pollutants on freshwater
microalgae**

**Toxicidade exercida por contaminantes acuáticos sobre
microalgas de auga doce**

Tesis de doctorado / PhD Thesis / Tese de Doutoramento

Marta Esperanza Llera

Directores / Supervisors / Directores

Dra. Carmen Rioboo Blanco

Dr. Andrés Martínez Lage

Tutor / Tutor / Titor

Dra. Ángeles Cid Blanco

Revisado por / Reviewed by / Revisado por

Dr. Alfonso Blanco (University College Dublin)

Dra. Maeva Giraud (Environment and Climate Change Canada)

Depósito / Deposit / Depósito: Octubre / October / Outubro 2017

Defensa / Defense / Defensa: Diciembre / December / Decembro 2017

Departamento de Biología. Facultade de Ciencias da UDC.

Programa oficial de Doutoramento en Biología Celular e Molecular. RD 99/2011.

La Dra. CARMEN RIOBOO BLANCO, Profesora Contratada Doctora del área de Microbiología del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña y el Dr. ANDRÉS MARTÍNEZ LAGE, Profesor Titular de Universidad del área de Genética del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña,

INFORMAN:

que la licenciada en Biología y alumna del tercer ciclo del programa de Doctorado de Biología Celular y Molecular **Dña. Marta Esperanza Llera**, ha realizado en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la Coruña el trabajo con el título **“Toxicidad ejercida por contaminantes acuáticos sobre microalgas de agua dulce”** bajo nuestra dirección y que presenta para optar al Grado de Doctor internacional. Considerándolo finalizado, autorizamos su presentación y defensa.

Y para que así conste, firmamos el presente en:

A Coruña, 2017

Vº Bº de los Directores

Fdo. Dra. Carmen Rioboo Blanco

Fdo. Dr. Andrés Martínez Lage

La doctoranda

Fdo. Marta Esperanza Llera



Environment and
Climate Change Canada

Environnement et
Changement climatique Canada

Canada



Parte de la investigación presentada en esta tesis ha sido realizada bajo la supervisión de la Dra. Magali Houde, investigadora en “Environment and Climate Change Canada”, durante una estancia de investigación predoctoral en el año 2016 financiada por la Fundación Barrié.

Part of the research included in this thesis was been carried out under the supervision of Dra. Magali Houde, researcher in Environment and Climate Change Canadá, during a pre-doctoral internship in 2016 with a “Fundación Barrié” grant.

A mi familia

Agradecimientos

Llegado este momento, sólo puedo dar las gracias a todos los que, de una forma u otra, han colaborado en la realización de este trabajo, el desarrollo de la presente tesis no sólo es fruto del trabajo personal sino que su realización no habría sido posible sin el apoyo de muchas personas. Todos habéis sido una enorme motivación para continuar trabajando y aprendiendo.

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. Carmen Rioboo y a la Dra. Ángeles Cid. Gracias por vuestra inestimable ayuda y continuo apoyo así como por vuestra contagiosa fuerza, pasión, vitalidad y positivismo. Gracias por darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de investigación y por haberme transmitido todas las herramientas necesarias para llevar a cabo este trabajo.

En segundo lugar deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Andrés Martínez, sin cuya ayuda no habría sido posible la realización de este trabajo.

También quiero dar mi sincero agradecimiento a todo el personal del laboratorio de Microbiología, especialmente a Concepción Herrero, Pablo Fidalgo, Enrique Torres, Rosa García y Julio Abalde, que además de instruirme en el manejo de equipos y técnicas en el laboratorio, me han asesorado y animado durante en el desarrollo de esta tesis.

Además, quiero destacar el especial recuerdo que guardo de la Dra. Raquel Prado, durante toda su vida fue una luchadora, con determinación y esfuerzo pudo alcanzar todas las metas que se propuso. Gracias también por iniciarme en el mundo de la citometría y las microalgas y por transmitirme tu entusiasmo por la investigación siempre con una sonrisa.

Del mismo modo, quiero dar las gracias a mis compañeros de laboratorio por su ayuda y apoyo, especialmente a Marta Seoane, mi compañera de poyata, docencia y congresos, colaboradora principal de mis publicaciones y mi gran apoyo durante la tesis, juntas hemos compartido los mismos nervios, miedos, alegrías e ilusiones, ha sido un placer compartir estos años contigo. Les deseo a ella, a Roi Mera y a Sergio Santaefemia un futuro prometedor como investigadores, mucho ánimo y mucha suerte.

A todas las personas que forman parte del laboratorio de ecotoxicología de "Environment and Climate Change Canada" por hacerme sentir parte de su laboratorio desde el primer momento. Magali Houde, gracias por tu cercanía y generosidad y por haberme dado la oportunidad de vivir una experiencia inolvidable tanto a nivel personal como profesional. Me gustaría agradecer en especial a Romy, Melanie, Maxime y Houda, gracias por vuestra ayuda e implicación en el trabajo. Y en general, gracias a todo el grupo por vuestra hospitalidad y amabilidad durante mi estancia. Ha sido genial trabajar con todos vosotros.

A mis amigos que siempre están cuando se necesitan sin importar la distancia. Gracias por escucharme siempre y animarme en los momentos de estrés, por los cafés, por las cenas y por las clases de Zumba que hacen olvidar todos los problemas. Gracias Marta y Paula, ya sabéis que juntas somos la tostada perfecta.

A toda mi familia, lo más importante y valioso de mi vida, en especial a mi madre. Gracias por apoyarme siempre, por animarme a seguir adelante y por enseñarme que con trabajo y esfuerzo se pueden cumplir tus sueños.

Y por supuesto, a Gabriel, mi compañero de viaje. Gracias por ser como eres, por tu apoyo, por entenderme, por motivarme y por cuidarme.

Nunca os podré agradecer todo lo que me habéis dado. Todo lo que he conseguido es gracias a vosotros y esta tesis es también un triunfo vuestro.

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a una beca de tercer ciclo concedida por la Xunta de Galicia y una beca para la realización de una estancia predoctoral internacional de la Fundación Barrié.

Gracias

“El crecimiento es un proceso de prueba y error: es una experimentación. Los experimentos fallidos forman parte del proceso en igual medida que el experimento que funciona bien.”

Benjamin Franklin (1706-1790)

“La vida es una obra de teatro que no permite ensayos. Por eso, canta, ríe, baila, llora y vive intensamente cada momento de tu vida, antes que el telón baje y la obra termine sin aplausos.”

Charles Chaplin (1889-1977)

“Caminando en línea recta no puede uno llegar muy lejos.”
El principito (1943) de Antoine de Saint-Exupéry (1900-1944)

Índices y resúmenes

Toxicidad ejercida por
contaminantes acuáticos sobre
microalgas de agua dulce



Índice general

Índice general	I
Índice de figuras	V
Índice de tablas	IX
Lista de abreviaturas	XI
Resumen/ Resumen/ Abstract	XV
Resumen (versión extendida)	XVII
Resumo (versión extendida)	XXI
Abstract (extended version)	XXV

1. Introducción	1
1.1. Contaminación en los ecosistemas acuáticos.....	3
1.2. Contaminantes químicos.....	3
1.3. Bioensayos con microalgas.....	10
1.4. Parámetros habitualmente estudiados en los bioensayos de toxicidad de pesticidas con microalgas.....	16
1.4.1. Estudios de crecimiento, viabilidad y morfología celular.....	16
1.4.2. Actividades enzimáticas.....	17
1.4.3. Actividad fotosintética.....	18
1.4.4. Composición bioquímica celular.....	19
1.5. El desarrollo de las “ómicas”.....	19
2. Objetivos	33
3. Materiales y métodos	37
3.1. Descripción de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Dangeard.....	39
3.2. Cultivo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	42
3.3. Diseño experimental.....	43
3.4. Determinación espectrofotométrica de pigmentos fotosintéticos.....	45

3.5. Análisis de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> por citometría de flujo (FCM).....	45
3.5.1. Determinación de la densidad celular.....	48
3.5.2. Análisis del tamaño celular y autofluorescencia celular.....	49
3.5.3. Análisis de viabilidad celular.....	50
3.5.4. Análisis <i>in fluxo</i> de la actividad esterasa inespecífica en tiempo real.....	51
3.5.5. Análisis del estrés oxidativo.....	53
3.5.6. Análisis de la concentración de Ca ²⁺ libre intracelular.....	56
3.5.7. Análisis del potencial de membrana citoplasmática.....	58
3.5.8. Análisis del potencial de membrana mitocondrial.....	60
3.5.9. Análisis de la actividad caspasa.....	61
3.6. Análisis mediante microscopía de fluorescencia.....	62
3.6.1. Estudio de alteraciones en el núcleo.....	63
3.6.2. Estudio de la presencia de vacuolas autofágicas.....	64
3.7. Análisis mediante espectrofotometría.....	65
3.7.1. Peroxidación lipídica.....	65
3.7.2. Actividad catalasa.....	66
3.8. Análisis de alteraciones a nivel del transcriptoma.....	66
3.8.1. RNA-Seq.....	66
3.8.2. RT-qPCR de enzimas antioxidantes.....	67
3.9. Análisis de alteraciones a nivel del proteoma.....	69
3.10. Análisis estadístico.....	71
4. Capítulos.....	73
4.1. Capítulo I “Early alterations on photosynthesis-related parameters in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cells exposed to atrazine: A multiple approach study”.....	75
4.2. Capítulo II “ <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cells adjust the metabolism to maintain viability in response to atrazine stress”.....	89
4.3. Capítulo III “Does a short-term exposure to atrazine provoke cellular senescence in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ?”.....	101
5. Discusión.....	113

6. Conclusiones.....	147
7. Conclusions.....	151
8. Bibliografía.....	155
9. Anexos.....	203
9.1. Anexo I. Material suplementario transcriptómica.....	205
9.1.1. Genes diferencialmente expresados en los cultivos expuestos a 0,25 μ M de atrazina con respecto a los cultivos control a las 3 h (Transcriptómica 3 h).....	205
9.1.2. Genes diferencialmente expresados en los cultivos expuestos a 0,25 μ M de atrazina con respecto a los cultivos control a las 24 h (Transcriptómica 24 h).....	215
9.1.3. Genes diferencialmente expresados en los cultivos expuestos a 0,25 μ M de atrazina con respecto a los cultivos control a las 96 h (Transcriptómica 96 h).....	217
9.2. Anexo II. Material suplementario proteómica.....	221
9.2.1. Proteínas diferencialmente expresados en los cultivos expuestos a 0,25 μ M de atrazina con respecto a los cultivos control a las 3 h (Proteómica 3 h).....	221
9.2.2. Proteínas diferencialmente expresados en los cultivos expuestos a 0,25 μ M de atrazina con respecto a los cultivos control a las 24 h (Proteómica 24 h).....	222
9.3. Anexo III. Publicaciones y comunicaciones en congresos.....	223
9.3.1. Publicaciones.....	223
9.3.2. Comunicaciones en congresos.....	224

Índice de figuras

Figura 1.	Estructura química de la atrazina (AZT) (https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/atrazine21568191224911?lang=es&region=ES).....	7
Figura 2.	Mecanismo de acción de las triazinas. Interrupción del flujo de electrones en el fotosistema II (PSII) cuando el herbicida desplaza una plastoquinona (PQ) de su sitio de unión con la proteína D1 (Q _B) del fotosistema II (PSII) (https://www.btny.purdue.edu/WeedScience/MOA/Photosynthetic_Inhibitors/text.html).	9
Figura 3.	Genómica, transcriptómica y proteómica (http://www.innovabiologia.com/biodiversidad/diversidad-animal/evolucion-electroforesis-proteinas/).....	20
Figura 4.	Procedimiento de trabajo utilizando la técnica de RT-qPCR (Imagen modificada de https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-applications.html).....	21
Figura 5.	Procedimiento de trabajo utilizando la técnica de RNA-Seq (http://bio.lundberg.gu.se/courses/vt13/rnaseq.html).....	23
Figura 6.	Componentes de un espectrómetro de masas.....	26
Figura 7.	Reactivo iTRAQ (A) y ejemplo de flujo de trabajo en proteómica usando iTRAQ con 4 reactivos (B) (Imagen modificada de https://sciex.com/community/blogs/blogs/the-history-of-isotopic-labels-for-quantitative-proteomics).....	28
Figura 8.	Esquema de una célula <i>Chlamydomonas</i> donde se observa: flagelos enraizados en los cuerpos basales y presencia de partículas por el transporte del intraflagelar (IFT) entre el axonema y la membrana flagelar, cloroplasto basal en forma de copa, núcleo central y otros orgánulos. También se representa una sección ampliada del axonema flagelar, con nueve dobletes exteriores y el par central de microtúbulos (9+2), las subestructuras del axonema están codificadas por colores y etiquetadas (Imagen izquierda) (Merchant et al., 2007). Célula de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . La imagen fue tomada con un microscopio Nikon Eclipse E400 (Imagen derecha).....	40
Figura 9.	Cultivos de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> expuestos a concentraciones crecientes de atrazina durante 96 h en matraces (Izquierda) y en placa Petri (Derecha).....	45

- Figura 10.** Componentes de un citómetro de flujo (Imagen modificada de <http://nptel.ac.in/courses/102103016/19>).....**47**
- Figura 11.** Validación del método de análisis de vitalidad celular mediante FCM utilizando PI. Los citogramas muestran los porcentajes de células viables (PI-) y no viables (PI+) correspondientes a mezclas de células vivas/muertas: 100/0% **(A)**; 0/100% **(B)** y 50/50% **(C)**.....**51**
- Figura 12.** Incremento de la emisión de fluorescencia de la fluoresceína (recogida en el detector FL1) a lo largo del tiempo, como resultado de la rotura enzimática del diacetato de fluoresceína por esterasas intracelulares, en un cultivo control, que no ha sido sometido a ningún tipo de estrés **(A)** y en un cultivo con células no viables, que han sido sometidas a choque térmico con microondas **(B)**.....**53**
- Figura 13.** Validación del método de determinación de ión superóxido intracelular mediante FCM. Se representan los citogramas correspondientes a un cultivo control **(A)**, un cultivo sometido a H₂O₂ 5 mM **(B)** y un cultivo sometido a H₂O₂ 10 mM **(C)**.....**55**
- Figura 14.** Validación del método de determinación del peróxido de hidrógeno intracelular mediante FCM. Se representan los citogramas correspondientes a un cultivo control **(A)**, un cultivo sometido a H₂O₂ 5 mM **(B)** y un cultivo sometido a H₂O₂ 10 mM **(C)**...**56**
- Figura 15.** Validación del método de análisis de la Ca²⁺ intracelular mediante FCM. Se representan los citogramas correspondientes a suspensiones de células teñidas con *Calcium Green-1 AM* en ausencia de mastoparan **(A)** y en presencia de 14 µM de mastoparan **(B)**.....**57**
- Figura 16.** Validación del método de determinación del potencial de membrana citoplasmático mediante FCM. Se representan los citogramas correspondientes a un cultivo control sin digitonina **(A)**, un cultivo control con digitonina **(B)**, [KCl] = 10 mM **(C)**, un cultivo en tampón con [KCl] = 10 mM e incubado con digitonina **(D)**.....**59**
- Figura 17.** Validación del ensayo de determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante FCM. En los citogramas biparamétricos se representa la fluorescencia emitida por la forma monomérica (FL1) del fluorocromo JC-1 frente a la fluorescencia emitida por la forma agregada (FL3) del mismo, para células control **(A)** y células incubadas con CCCP **(B)**.....**61**
- Figura 18.** Validación del método de la actividad caspasa mediante FCM. Se representan los citogramas correspondientes a suspensiones de células teñidas con Caspase-3/7 Green en ausencia de cobre **(A)** y en presencia de 7,5 mg L⁻¹ de cobre **(B)**.....**62**

- Figura 19.** Células de *C. reinhardtii*, expuestas a 7,5 mg L⁻¹ de cobre durante 24 h, vistas por microscopía de epifluorescencia y teñidas con DAPI. Las flechas rojas indican células con alteraciones en la cromatina del núcleo (DAPI+) y las flechas azules indican células sin alteraciones en el núcleo (DAPI-)..... **64**
- Figura 20.** Células de *C. reinhardtii*, expuestas a 7,5 mg L⁻¹ de cobre durante 24 h, vistas por microscopía de epifluorescencia y teñidas con MDC. La flecha roja indica una célula con autofagosomas (MDC+) y la flecha azul indica una célula sin autofagosomas (MDC-)..... **65**
- Figura 21.** Esquema del mecanismo de acción del herbicida atrazina sobre la microalga *C. reinhardtii*. La atrazina afecta a diversos procesos celulares a través de vías de señalización mediadas por Ca²⁺ y especies reactivas de oxígeno (O₂⁻ y H₂O₂). Estos procesos celulares incluyen disminución de la actividad celular, despolarización de la membrana plasmática, hiperpolarización de la membrana mitocondrial, disminución de la actividad fotosintética, reducción en el contenido de pigmentos celulares y cambios en la expresión de genes relacionados con la actividad antioxidante celular. Además genes y proteínas relacionados con la fotosíntesis aparecen subexpresados, mientras que los relacionados con la generación de energía heterotrófica y la disposición de electrones aparecen sobreexpresados. Por último, el incremento intracelular de los niveles de ROS podría estar relacionada con la aparición de marcadores típicos de muerte celular programada como la presencia de autofagosomas, los cambios morfológicos en el núcleo y el aumento de la actividad caspasa..... **145**

Índice de tablas

Tabla 1. Muestras analizadas mediante RNA-Seq.....	67
Tabla 2. Genes, abreviaturas y <i>primers</i> utilizados para los análisis RT-qPCR en <i>C. reinhardtii</i>	69
Tabla 3. EC ₅₀ a las 96 h para el crecimiento de diferentes especies microalgales expuestas a atrazina.....	118

Lista de abreviaturas

- AbArrays** → Arrays de anticuerpos, *AntiBody Arrays*
- ANOVA** → Análisis de varianza, *ANalysis Of VAriance*
- APX I** → Ascorbato peroxidasa, *Ascorbate PeroXidase*
- ASC** → Ascorbato, *ASCorbate*
- ATZ** → Atrazina, *AtraZine*
- BSA** → Seroalbúmina bovina, *Bovine Serum Albumin*
- BTUB** → Beta tubulina 2, *Beta TUBuline 2*
- CAT** → Catalasa, *Catalase*
- CAGE** → Análisis de la expresión génica con tapa, *Cap Analysis of Gene Expression*
- CBLP** → Polipeptido parecido a la subunidad beta de la proteína G, *protein beta subunit-like polypeptide*
- CCAP** → Colección de Cultivos de Algas y Protozoos, *Culture Collection of Algae and Protozoa*
- CCCP** → Carbonilcianida m-clorofenilhidrazona, *CarbonylCyanide m-ChloroPhenylhydrazone*
- CHAPS** → 3-[(3-Colamidopropil)- dimetilamonio]-propano sulfonato, *3-[(3-CHolamidopropyl)dimethylAmmonio]-1-PropaneSulfonate*
- DAPI** → 4',6-diamidino-2-fenilindol, *4',6- DiAmidino-2-PhenylIndole*
- DEPC** → Pirocarbonato de dietilo, *DiEthyl PyroCarbonate*
- DEVD** → Péptido Asp-Glu-Val-Asp, *Asp-Glu-Val-Asp peptide*
- DHA** → Ácido dehidroascórbico, *DeHydroAscorbic acid*
- DHAR** → Dehidroascorbato reductasa, *DeHydroAscorbate Reductase*
- DHR 123** → Dihidrorodamina 123, *DiHydroRhodamine 123*
- DiBAC₄(3)** → Bis-(1,3-ácido dibutilbarbitúrico) trimetino oxonol, *Bis-(1,3-DlbutylBarbituric ACid trimethine oxanol*
- DIGE** → Electroforesis diferencial en gel, *Differential Gel Electrophoresis*
- DMSO** → Dimetilsulfóxido, *Dimethyl Sulfoxide*
- DNAc** → Ácido desoxirribonucleico complementario, *complementary DeoxyriboNucleic Acid*
- DO** → Densidad Óptica, *Optical density*
- EEC** → Comunidad económica europea, *European Economic Community*
- EC** → Comisión europea, *European Commission*
- EC₅₀** → Concentración efectiva media, *Half maximal Effective Concentration*
- EPA** → Agencia de protección ambiental, *Environmental Protectio Agency*
- ESTs** → Marcador de secuencia expresada, *Expressed Sequence Tag*
- FAO** → Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

- FCM** → Citometría de flujo, *Flow CytoMetry*
- FDA** → Diacetato de fluoresceína, *Fluorescein DiAcetate*
- FDR** → Tasa de falso descubrimiento, *False Discovery Rate*
- FL** → Fluorescencia, *FLuorescence*
- FL lin** → Fluorescencia lineal, *lineal FLuorescence*
- FL log** → Fluorescencia logarítmica, *logarithmic FLuorescence*
- FS** → Luz refractada en un ángulo $<20^\circ$, *Foward Scatter light*
- GPX** → Glutatión peroxidasa, *Glutathione PeroXidase*
- GR** → Glutatión reductasa, *Glutathione Reductase*
- GSH** → Glutatión reducido, *reduced Glutathione*
- GSSH** → Glutatión oxidado, *oxidised Glutathione*
- GST** → Glutatión S-transferasa, *Glutathione S-Transferase*
- HE** → Hidroetidina, *HydroEthidine*
- HPLC** → Cromatografía líquida de alta eficacia, *High Performance Liquid Chromatograph*
- I** → Intensidad de luz transmitida, *Intensity of transmitted light*
- I₀** → Intensidad de luz incidente, *Intensity of incident light*
- ICAT** → Etiqueta de afinidad marcado con isótopos, *Isotope-Coded Affinity Tag*
- IRIS** → Sistema integrado de información sobre riesgos, *Integrated Risk Information System*
- ISO** → Organización Internacional de Normalización, *International Organization for Standardization*
- iTRAQ** → Marcaje isobárico para la cuantificación relativa y absoluta, *Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*
- IUPAC** → Unión internacional de química pura y aplicada, *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- JC-1** → Ioduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'- tetraetilbenzimidazolocarbocianina, *5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarbocyanine iodide*
- LFC** → *Log2 Fold Change*
- LMA** → Agarosa con bajo punto de fusión, *Low Melting Agarose*
- LP** → Peroxidación lipídica, *Lipid Peroxidation*
- MALDI TOF** → Desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a un analizador tiempo de vuelo, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*
- MDA** → Malondialdehído, *Malondialdehyde*
- MDC** → Monodansilcadaverina, *MonoDansylCadaverine*
- MDHAR** → Monodehidroascorbato reductasa, *MonoDeHydroAscorbate Reductase*
- MPSS** → Secuenciación masiva de firma paralela, *Massively Parallel Signature Sequencing*
- MS** → Espectrometría de masas, *Mass Spectrometry*

-
- MS/MS** → Espectrometría de masas en tandem, *Tandem Mass Spectrometry*
- MSFD** → Marco de referencia de la directiva de la estrategia marina, *Marine Strategy Framework Directive*
- MuDPIT** → Tecnología de identificación de proteínas multidimensional, *Multidimensional protein identification technology*
- NADPH** → Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducida), *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (reduced)*
- NADP⁺** → Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidada), *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (oxidised)*
- NGS** → Secuenciación de próxima generación, *Next-Generation Sequencing*
- NIOSH** → Insituto nacional de salud y seguridad ocupacional, *National Institute for Occupational Safety and Health*
- OECD** → Organización para la cooperación y el desarrollo económicos, *Organisation for Economic Co-operation and Development*
- OSHA** → Administración de seguridad y salud ocupacional, *Occupational Safety and Health Administration*
- PATI** → Índice de toxicidad de ensamblaje de la planta, *Plant Assemblage Toxicity Index*
- PBS** → Tampón fosfato salino, *Phosphate-Buffered Saline*
- PDC** → Muerte celular programada, *Programmed Cell Death*
- PI** → Ioduro de propidio, *Propidium Iodide*
- PM** → Peso Molecular, *molecular weight*
- PQ** → Plastoquinona, *PlastoQuinone*
- PS** → Fotosistema, *PhotoSystem*
- PSI** → Fotosistema I, *PhotoSystem I*
- PSII** → Fotosistema II, *PhotoSystem II*
- PTMs** → modificaciones post-traduccionales, *Post-translational Modifications*
- RC-MS** → Cromatografía de retención-espectrometría, *Retentate Chromatography-Mass Spectrometry*
- REACH** → Registro, evaluación y autorización de químicos, *Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals*
- ROS** → Especies reactivas de oxígeno, *Reactive Oxygen Species*
- RT-qPCR** → Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa, *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*
- SAGE** → Análisis en serie de la expresión génica, *Serial Analysis of Gene Expression*
- SANCO** → Sanidad y consumo de la comisión europea, *Health and Consumers of the European Commission*
- SDS** → Dodecilsulfato sódico, *Sodium Dodecyl Sulfate*

SDS-PAGE → Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SELDI → Desorción-Ionización por Láser de Superficie, *Surface-Enhanced Laser-Desorption-Ionization*

SILAC → Etiquetado de isótopos estables de aminoácidos en cultivo celular, *Stable Isotopic Labeling with Amino acids in Cell culture*

SISCAPA → Isótopos estables con la captura de anticuerpos anti-péptido, *Stable Isotope Standards, Capture by AntiPeptide Antibodies*

SOD-1 → Mn-superóxido dismutasa, *Mn-SuperOxide Dismutase*

SS → Luz refractada en el ángulo lateral, *Side Scatter light*

TAP → Tris-acetato-fosfato, *Tris-Acetate-Phosphate*

TBA → Ácido tiobarbitúrico, *ThioBarbituric Acid*

TBARS → Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, *ThioBarbituric Acid Reactive Substances*

T.C. → Tasa de Crecimiento, *Growth rate*

TCA → Ácido trocloracético, *TriChloroAcetic acid*

u.a. → Unidades Arbitrarias, *arbitrary units*

UBCX → Enzima E2 conjugada con ubiquitina, *Ubiquitin-conjugating enzyme E2*

UE → Unión europea, *European Union*

US EPA → Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos, *United States Environmental Protection Agency*

WFD → Marco de referencia de la directiva del agua, *Water Framework Directive*

Resumen

Debido al uso extendido de herbicidas en la agricultura, su presencia en las aguas naturales es cada vez más importante. Estos contaminantes ejercen su actividad tóxica sobre algunas especies de plantas o de microorganismos fototróficos para los que no se habían diseñado, como las microalgas. Estos organismos unicelulares se encuentran en la base de la cadena trófica de los sistemas acuáticos, y cualquier agente externo que los perturbe puede ocasionar un desequilibrio mayor en los niveles superiores de la cadena, provocando modificaciones funcionales y estructurales permanentes en los ecosistemas. El proyecto que se ha llevado a cabo aborda el estudio de la respuesta de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, sometida a un estrés provocado por la atrazina, evaluando los cambios producidos en las células a corto y medio plazo, a través de una aproximación metodológica basada en el análisis del citoma, proteoma y transcriptoma de esta especie para caracterizar en profundidad la interacción xenobiótico-célula. Las alteraciones moleculares y celulares obtenidas sugieren que la exposición a sustancias químicas, como la atrazina, induce una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno que produce alteraciones fisiológicas y bioquímicas en las células que finalmente conllevan a fenómenos de senescencia celular en las poblaciones microalgales.

Resumo

Debido ao uso estendido de herbicidas na agricultura, a súa presenza en augas naturais é cada vez máis importante. Estes contaminantes exercen a súa actividade tóxica sobre algunhas especies de plantas ou de microorganismos fototróficos para os que non se deseñaron, como as microalgas. Estes organismos unicelulares atópanse na base da cadea trófica dos ecosistemas acuáticos, e calquera axente externo que os perturbe pode causar un desequilibrio maior nos niveis superiores da cadea, provocando modificacións funcionais e estruturais permanentes nos ecosistemas. O proxecto levado a cabo trata sobre o estudo da resposta da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, sometida a situación de estrés provocada pola atrazina, avaliando os cambios que se producen nas células a curto e medio prazo, a través dunha aproximación metodolóxica baseada na análise do citoma, proteoma e transcriptoma desta especie para caracterizar en profundidade a interacción xenobiótico-célula. Os cambios moleculares e celulares obtidos nestes estudos suxiren que a exposición a produtos químicos, como a atrazina, induce a produción excesiva de especies reactivas de osíxeno que produce cambios fisiolóxicos e bioquímicos nas células que finalmente conducen a fenómenos de senescencia celular en poboacións microalgais.

Abstract

High concentrations of herbicides proceeding from the agricultural practices come to the aquatic systems, where they exercise its toxic action on no-target organisms, such as microalgae. These organisms are in the base of the trophic chain; any alteration carries effects of long scope on the set of the trophic chain and the flow of energy of the ecosystem, causing permanent functional and structural modifications in ecosystems. The main purpose of this project was to penetrate into the knowledge of the cellular response of the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, to stress situations provoked by the exposure to atrazine. A methodological approach based on the analysis of the cytome, proteome and transcriptome of this microalga was proposed to characterize in depth the interaction xenobiotic-cell. Molecular and cellular alterations reported in the present work suggest that exposure to chemical substances, such as atrazine, induces ROS that produces physiological and biochemical alterations in cells that finally lead to the occurrence of cellular senescence alterations in the microalgal populations.

Resumen (versión extendida)

La actividad antropogénica es una amenaza constante a la estabilidad de los ecosistemas y la evaluación del riesgo ecológico de los contaminantes orgánicos, incluidos los herbicidas, se ha convertido en un campo prioritario en la investigación ecotoxicológica actual. En este sentido, los sistemas acuáticos son receptores de muchos productos químicos con potenciales efectos nocivos sobre diversos procesos fisiológicos y biológicos de su biota. Una cantidad considerable de herbicidas aplicados en campos de cultivo entra en ecosistemas acuáticos de agua dulce a través de escorrentía superficial o lixiviación, llevando a la contaminación ambiental. Estos contaminantes ejercen su toxicidad en diferentes tipos de organismos que no eran el objetivo original, como las algas unicelulares, principales productores primarios de la cadena trófica acuática. Debido a esto, cualquier agente externo puede causar un desequilibrio importante en los niveles superiores de la cadena trófica, causando modificaciones funcionales y estructurales permanentes en los ecosistemas. Por lo tanto, se necesitan estudios diseñados para diagnosticar, evaluar y caracterizar la respuesta celular de las microalgas en situaciones de estrés.

En relación con las investigaciones de toxicidad y la evaluación del riesgo con microalgas, los parámetros como el crecimiento y la viabilidad son los más monitorizados tradicionalmente. Sin embargo, antes de que estos muestren un cambio significativo, la exposición puede afectar a otros parámetros fisiológicos celulares en concentraciones mucho más bajas del contaminante. Actualmente, con el desarrollo de la ómicas y la disponibilidad de secuencias completas de genomas, surgen nuevas alternativas para estudiar los efectos de los contaminantes en las microalgas. El objetivo principal de este trabajo de investigación básica es penetrar en el conocimiento de la respuesta celular del microalga *Chlamydomonas reinhardtii* sometida a una situación de estrés provocada por la presencia de una concentración subletal del herbicida atrazina. Para llevar a cabo esta investigación se propuso un enfoque metodológico basado principalmente en el análisis de los citoma, proteoma y transcriptoma de esta microalga para caracterizar en profundidad la interacción xenobiótico-célula.

En el primer trabajo se observó que una concentración subletal de atrazina (0,25 μM) altera el perfil transcriptómico y proteómico de células de *Chlamydomonas reinhardtii* tras 3 h de exposición al herbicida. La presencia del herbicida conduce a un aumento en los niveles celulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden estar relacionados con una disminución en el contenido de clorofila y, por tanto, una disminución en la actividad fotosintética que puede volver a provocar la producción de ROS, como un bucle. Además, este herbicida provoca desajustes fotosintéticos en las células de *C. reinhardtii* basadas en alteraciones observadas en perfil transcriptómico, así como la desaparición de algunas proteínas relacionadas con la fotosíntesis. La inhibición de la fotosíntesis inducida por la

toxicidad de la atrazina afectará a al estado fisiológico y bioquímico de las células microalgales. Teniendo en cuenta estos resultados, el aumento de algunos contaminantes en los sistemas acuáticos podría conducir a una disminución dramática en la fijación del CO₂ a nivel mundial.

En el segundo trabajo se observó que la atrazina (0,25 µM), tras 3 y 24 h de exposición, altera el estatus energético de las células de *C. reinhardtii*. Usando protocolos de citometría de flujo (FCM) se observó un descenso de la actividad celular, una despolarización de la membrana plasmática y una hiperpolarización de la membrana mitocondrial en todos los cultivos expuestos al herbicida con respecto a los cultivos control. El análisis por RNA-Seq también mostró una alteración energética. Los datos transcriptómicos revelaron mayor abundancia de los transcritos relacionados con la generación de energía heterotrófica y disposición de electrones en las células estresadas. Los cambios más significativos se observan en los genes implicados en el catabolismo de aminoácidos y en los procesos de respiración celular. Los resultados obtenidos sugieren una inhibición de la fotosíntesis provocada por el mecanismo de acción del herbicida, debido a esto las células tienen que obtener energía a través del metabolismo heterotrófico para mantener su viabilidad.

A la vista de todas las alteraciones observadas en los estudios anteriores, el tercer trabajo se centra en el estudio de fenómenos de senescencia celular o muerte celular programada (PCD) en las células de *C. reinhardtii* expuestas durante 24 h a una concentración subletal de atrazina (0,25 µM) y en células no expuestas a atrazina y en fase estacionaria a las 96 h. Los resultados de los niveles intracelulares de calcio sugieren que este ion puede actuar como un mensajero transitorio en la transducción de la señal en células de *C. reinhardtii* expuestas a condiciones de estrés, ya que se observó un incremento tras una exposición corta a atrazina. Ambos tratamientos experimentales provocan un incremento en la generación de ROS, sugiriendo que el mecanismo común de acción entre ambos tratamientos (químico y escasez de nutrientes) puede ser el estrés oxidativo. Además, la modificación de la expresión de genes relacionados con actividad antioxidante observada en este trabajo sugiere un sistema antioxidante versátil y flexible en respuesta a la sobreproducción de ROS. Este incremento en los niveles de ROS puede estar relacionado con la aparición de marcadores de PCD en ambos tratamientos experimentales. Cultivos no expuestos en fase estacionaria muestran activación de caspasas, alteraciones en la morfología del núcleo y presencia autofagosomas en las células de *C. reinhardtii*, indicando senescencia celular en estos cultivos. Estas características de senescencia también aparecen en niveles similares de alteración en los cultivos expuestos al herbicida durante 24 h, sugiriendo que una exposición a corto plazo a una concentración subletal de atrazina induce características de la senescencia en células microalgales.

Las alteraciones moleculares y celulares obtenidas en estos trabajos sugieren que la exposición a sustancias químicas, como la atrazina, induce una sobreproducción de ROS que

produce alteraciones fisiológicas y bioquímicas en las células que finalmente conllevan a fenómenos de senescencia celular en las poblaciones microalgales, comprometiendo la biodiversidad, estructura y función de los niveles más altos de la cadena trófica en los ecosistemas de agua dulce.

Resumo (versión estendida)

A actividade antrópica é unha constante ameaza a estabilidade dos ecosistemas e a avaliación do risco ecolóxico dos contaminantes orgánicos, incluíndo os herbicidas, tornouse unha área prioritaria na investigación ecotoxicolóxica actual. A este respecto, os sistemas acuáticos son receptores de moitos produtos químicos con potenciais efectos nocivos sobre varios procesos fisiolóxicos e biolóxicos da biota. Un número considerable de herbicidas aplicados nos campos de cultivo entran nos ecosistemas acuáticos de auga doce mediante escorrentía superficial ou lixiviación, levando a contaminación ambiental. Estes contaminantes exercen a súa toxicidade en diferentes tipos de organismos que non eran o branco orixinal, como as algas unicelulares, principais produtores primarios da cadea alimentaria acuática. Debido a isto, calquera axente externo pode provocar un desequilibrio importante nos niveis superiores da cadea alimentaria, causando alteracións funcionais e estruturais permanentes nos ecosistemas. Polo tanto, son necesarios estudos destinados a diagnosticar, avaliar e caracterizar a resposta celular de microalgas en situacións estresantes.

En relación a investigacións de toxicidade e avaliación de riscos en microalgas, os parámetros tales como o crecemento e a viabilidade son os máis monitorizados tradicionalmente. Con todo, antes de que estes mostren un cambio significativo, a exposición pode afectar outros parámetros fisiolóxicos celulares en concentracións moito máis baixas do contaminante. Hoxe, co desenvolvemento das ómicas e a dispoñibilidade de secuencias xenómicas completas, emerxen novas formas de estudar os efectos dos contaminantes sobre microalgas. O principal obxectivo deste traballo de investigación básica é penetrar no coñecemento da resposta celular da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* sometida a unha situación estresante causada pola presenza dunha concentración subletal do herbicida atrazina. Para levar a cabo esta investigación propúxose unha metodoloxía baseada principalmente na análise de citoma, proteoma e transcriptoma desta microalga para caracterizar en profundidade a interacción de xenobiótico-célula.

No primeiro traballo observouse que unha concentración subletal de atrazina (0,25 μM) altera o perfil transcriptómico e proteómico das células de *Chlamydomonas reinhardtii* tras 3 h de exposición o herbicida. A presenza do herbicida conduce a un aumento nos niveis celulares de especies reactivas de osíxeno (ROS) que poden relacionarse cunha diminución no contido de clorofila y, polo tanto, nunha diminución da actividade fotosintética que pode provocar a produción de ROS, coma nun bucle. Ademais, este herbicida fai desaxustes fotosintéticos nas células de *C. reinhardtii* baseados nas alteracións observadas no perfil transcriptómico así coma da desaparición dalgunhas proteínas relacionadas coa fotosíntese. A inhibición da fotosíntese inducida pola toxicidade da atrazina afecta ao estado fisiolóxico e bioquímico das células microalgais. Tendo en conta estes resultados, o aumento dalgúns contaminantes nos

sistemas acuáticos pode levar a unha diminución dramática na fixación de CO₂ en todo o mundo.

No segundo estudo, observouse que a atrazina (0,25 µM), despois de 3 e 24 horas de exposición, modifica o estado de enerxía das células *C. reinhardtii*. Empregando protocolos de citometría de fluxo (FCM) observouse unha diminución na actividade celular, unha despolarización da membrana plasmática e unha hiperpolarización da membrana mitocondrial en todos os cultivos expostos ao herbicida en comparación cos cultivos control. O análise de RNA-Seq tamén mostrou unha alteración enerxética. Os datos transcriptómicos revelaron unha maior abundancia de transcritos relacionados coa xeración de enerxía heterotróficas e o arranxo de electróns nas células estresadas. Os cambios máis significativos observáronse nos xenes implicados no catabolismo de aminoácidos e nos procesos de respiración celular. Os resultados indican unha inhibición da fotosíntese causada polo mecanismo de acción do herbicida, por mor disto as células teñen que obter enerxía a través do metabolismo heterotrófico para manter a viabilidade.

Tendo en conta todas as modificacións observadas nos estudos anteriores, o terceiro traballo enfocase no estudo de fenómenos relacionados coa senescencia celular ou a morte celular programada (PCD) en células de *C. reinhardtii* expostas durante 24 h a unha concentración subletal de atrazina (0,25 µM) e en células non expostas a atrazina en fase estacionaria a 96 h. Os resultados dos niveis intracelulares de calcio suxiren que este ión pode actuar como un mensaxeiro transitorio na transdución da sinal en células de *C. reinhardtii* en condicións de estrés, xa que un aumento foi detectado tras unha curta exposición á atrazina. Ámbolos tratamentos experimentais causan un aumento na produción de ROS, o que suxire que o mecanismo de acción común entre os dous tratamentos (químico e escaseza de nutrientes) pode ser o estrés oxidativo. Ademais, a modificación da expresión de xenes relacionados coa actividade antioxidante observado neste traballo suxire un sistema antioxidante versátil e flexible en resposta a produción excesiva de ROS. Este aumento nos niveis de ROS pode relacionarse coa aparición de marcadores de PCD en ámbolos tratamentos experimentais. Cultivos non expostos en fase estacionaria mostran unha activación da actividade caspasa, alteracións na morfoloxía do núcleo e presenza de autofagosomas nas células de *C. reinhardtii*, indicando senescencia celular nestes cultivos. Estas características de senescencia tamén aparecen en niveis similares de alteración nos cultivos expostos ao herbicida durante 24 h, suxerindo cunha exposición de curta duración a unha concentración subletal de atrazina induce características de senescencia de células microalgais.

Os cambios moleculares e celulares obtidos nestes estudos suxiren que a exposición a produtos químicos, como a atrazina, induce a produción excesiva de ROS que produce cambios fisiolóxicos e bioquímicos nas células que finalmente conducen a fenómenos de

senescencia celular en poboacións microalgais, comprometéndose a biodiversidade, estrutura e función dos niveis máis altos da cadea alimentaria nos ecosistemas de auga doce.

Abstract (extended version)

Anthropogenic activity is a constant menace to the stability of ecosystems and the ecological risk assessment of organic pollutants, including herbicides, has become a priority field in current ecotoxicological research. In this sense, aquatic systems are recipients of many chemicals with potential deleterious effects on various physiological and biological processes of their biota. A considerable amount of the herbicides applied in crop fields enters into freshwater aquatic ecosystems through surface runoff or leaching, leading to environmental contamination. These pollutants exert their toxicity on different types of organisms that were not the original target, such as unicellular algae, the primary producers in the aquatic food web. Due to this, any external agent can cause a major imbalance in the upper levels of the chain, causing permanent functional and structural modifications in ecosystems. Therefore, studies designed to diagnose, evaluate and characterize the cellular response of the microalgae in situations of stress are needed.

Regarding toxicity investigations and risk assessment with microalgae, integral endpoints, such as growth and viability, are traditionally monitored. However, before these endpoints show a significant change, the exposure may affect other cellular physiological parameters at much lower toxicant concentrations. Currently, with the development of the omics and the availability of full genomes sequences, new alternatives arise to study the effects of pollutants on microalgae. The main purpose of this work of basic research is to penetrate into the knowledge of the cellular response of the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, to situations of stress provoked by the presence of a sublethal concentration of the herbicide atrazine. A methodological approach mainly based on the analysis of the cytome, proteome and transcriptome of this microalga was proposed to characterize in depth the interaction xenobiotic-cell.

In the first study, a sublethal concentration of atrazine (0.25 μM) alters the transcriptomic and proteomic profile of *Chlamydomonas reinhardtii* cells after 3 h of exposure. The presence of atrazine leads to an increase in the cellular ROS levels that can be related to a decrease in chlorophyll content and, hence, in a decrease in the photosynthetic activity that can enhance the ROS production, as a loop. Furthermore, this herbicide causes photosynthetic adjustments in *C. reinhardtii* cells based on alterations observed in transcriptomic profile as well as the disappearance of some photosynthesis-related proteins. Taking into account these results, the increase in some pollutants in aquatic systems could lead to a dramatic decrease in CO_2 fixation at a global level.

In the second study, a sublethal concentration of atrazine (0.25 μM) alters the energy status of *C. reinhardtii* cells after 3 and 24 h of exposure. Using flow cytometric (FCM) protocols

a decrease of cellular activity, a plasma membrane depolarization and a hyperpolarization of the mitochondrial membrane were detected in atrazine exposed cells respect to control cells. RNA-Seq analysis also indicated this energy alteration since the transcriptomic data revealed higher abundances of transcripts related to heterotrophic energy generation and electron disposal in the stressed cells. The most significant changes were observed in genes implicated in amino acid catabolism and respiratory cellular processes. Obtained results suggest that photosynthesis inhibition by atrazine leads cells to get energy through a heterotrophic metabolism to maintain their viability.

In view of all alterations observed in the previous works, the third study is focused on the response of the freshwater microalga *C.reinhardtii* exposed to a sublethal concentration of the herbicide atrazine (0.25 μ M) for 24 h and in 96 h-unexposed stationary cultures was studied to investigate the effect of a chemical (herbicide) and nutrient deprivation on several senescence-related parameters. Results of intracellular levels of calcium suggest that this ion can act as a transitory messenger in the signal transduction of *C. reinhardtii* cells exposed to stress conditions, since an increase was detected after short-term exposure to atrazine. Both experimental treatments provoke an increment in ROS generation, suggesting that the common action mechanism between both treatments (chemical and starvation) may be oxidative stress. Moreover, the modification of the expression of antioxidant related-genes observed in this work suggests a versatile and flexible antioxidant system in response to ROS overproduction. This intracellular increment of ROS levels could be related to the occurrence of typical PCD hallmarks in both experimental treatments. Unexposed cultures in stationary phase showed an activation of caspase cascade, as well as nuclear morphological alterations and autophagosomes in *C. reinhardtii* cells, indicating cellular senescence in these cultures. These senescence characteristics also appear in cultures exposed to the herbicide with a similar level of alteration suggesting that a short-term exposure to a sublethal concentration of atrazine induces senescence features in microalgal cells.

Molecular and cellular alterations reported in the present work suggest that exposure to chemical substances, such as atrazine, induces ROS that produces physiological and biochemical alterations in cells that finally lead to the occurrence of cellular senescence alterations in the microalgal populations, potentially compromising biodiversity, structure and function of higher trophic levels in freshwater ecosystems.

1. *Introducción*

Toxicidad ejercida por
contaminantes acuáticos sobre
microalgas de agua dulce



1.1. Contaminación en los ecosistemas acuáticos

El término contaminación hace referencia a la presencia de productos y subproductos generados de la actividad humana que provocan desequilibrios en los ecosistemas naturales (atmósfera, suelos y aguas). La actividad antropogénica es una constante amenaza para la estabilidad de los ecosistemas y, en este sentido, los sistemas acuáticos son receptores de multitud de agentes químicos procedentes de la industria, las tareas agrícolas y de los núcleos urbanos que pueden tener un efecto directo sobre diferentes procesos fisiológicos, biológicos y poblacionales de la biota que los habita, alterando a la estructura de la comunidades biológicas (Campanella et al., 2001, Rioboo et al., 2007).

El deterioro de los sistemas acuáticos no es un problema reciente, aunque sí ha sido en el último siglo cuando este problema se ha generalizado y ha preocupado más a la sociedad. Por todo esto, la Comisión de Salud y Medio Ambiente de la OMS advierte reiteradamente que tanto la salud y el bienestar humanos, como la seguridad de los alimentos, el desarrollo industrial y los sistemas de los que aquellos dependen, se encuentran seriamente amenazados a menos que protejamos con más eficacia y responsabilidad nuestros lagos, ríos y mares, coordinando la gestión de recursos terrestres e hídricos y consiguiendo de esta manera un desarrollo sostenible. Los programas europeos de seguimiento de la calidad de las aguas existentes en la actualidad se basan casi exclusivamente en el análisis químico de las mismas, el cual solo aporta información sobre la concentración y la naturaleza de los compuestos presentes en una muestra de agua (Directiva 2013/39/UE). Sin embargo, este tipo de análisis presentan una serie de importantes limitaciones, ya que no detectan productos sin identificar, productos resultantes de un proceso de degradación, ni la existencia de interacciones antagónicas o sinérgicas entre compuestos presentes en el agua (Ginebreda et al., 2014, Posthuma y Zwart, 2012).

1.2. Contaminantes químicos

En los últimos años, el problema del impacto de los contaminantes químicos en los ecosistemas es cada día más complejo, por lo que es necesario un seguimiento definido de los contaminantes para el control y la reducción de este impacto. En 1981, se empleaban únicamente en la Unión Europea más de 100.000 sustancias químicas diferentes. Este número aumenta año tras año y sólo se conocen una mínima parte de los efectos adversos que estos compuestos podrían causar en el medio ambiente y/o en la salud humana (Baugros et al., 2008).

Mediante la Directiva 2000/60/CE y la Directiva 2013/39/EU del Parlamento Europeo y

del Consejo, la Unión Europea organiza la gestión de las aguas superficiales, continentales, de transición y aguas costeras y subterráneas, con el fin de prevenir y reducir su contaminación, fomentar su uso sostenible, proteger el medio acuático, mejorar la situación de los ecosistemas acuáticos y paliar los efectos de las inundaciones y de las sequías. Para ello, entre otras medidas, se ha establecido una lista de 45 sustancias prioritarias cuya contaminación debe ser progresivamente reducida o eliminada. Dentro de las sustancias prioritarias se pueden encontrar metales pesados y compuestos orgánicos tales como plaguicidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos o surfactantes. Todas estas sustancias son de una forma u otras nocivas para el medioambiente y/o seres humanos.

Por otro lado, la Agencia para la Protección del Medioambiente de Estados Unidos (US EPA) define a los productos químicos que se han descubierto en el agua y hasta ahora no habían sido detectados o se están detectando a niveles muy diferentes a lo esperado, como contaminantes de interés emergente debido a su potencial riesgo para la salud humana y para el medioambiente asociado a su presencia, frecuencia de detección y fuentes de emisión (Matamoros et al., 2016, Moro et al., 2014). Aunque durante décadas, la comunidad científica ha centrado sus esfuerzos en el estudio de los contaminantes químicos prioritarios cuya presencia en el medio ambiente ha estado o está regulada en las distintas legislaciones, en la actualidad el desarrollo de nuevos métodos de análisis más sensibles ha permitido alertar de la presencia de otros contaminantes potencialmente peligrosos denominados como emergentes que no se encuentran legislados por los reglamentos de la calidad de agua que existen en la actualidad (Richardson y Temes, 2011).

Por todo lo anteriormente comentado, la necesidad del desarrollo de métodos adecuados que permitan evaluar la presencia de contaminantes, así como estudiar la toxicidad de este tipo de sustancias sobre los organismos acuáticos, se ha convertido en uno de los principales objetivos dentro de la investigación medioambiental.

Cuanto mayor es la población que soporta nuestro planeta, más alimento se necesita. Por ello, durante las últimas décadas, la intensificación de la producción agrícola ha provocado un aumento en el uso generalizado de pesticidas, lo que está suponiendo la contaminación de acuíferos subterráneos y aguas de superficie (Storck et al., 2017). Según la definición del Código Internacional de la Dirección de la Distribución y del Uso de los Pesticidas de la FAO se denomina pesticida a “cualquier sustancia o mezcla de sustancias pensadas para prevenir, destruir o controlar cualquier peste, incluyendo factores de enfermedades humanas o de animales, especies de plantas o de animales no deseadas que causan daños durante la

producción procesamiento, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y sustancias de alimentación animal o que puedan ser administrados a animales para el control de insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre cuerpos”. A partir de la Segunda Guerra Mundial, y fundamentalmente en las últimas décadas, la síntesis de pesticidas químicos ha aumentado considerablemente. Si bien la información sobre el uso de pesticidas y los datos de mercado es escasa, en general está claro que el uso de plaguicidas sintéticos en la agricultura ha crecido de manera constante, y ahora asciende a 3,50 billones de kg de ingrediente activo por año, donde el consumo mundial de pesticidas se reparte entre herbicidas (40%), insecticidas (33%), fungicidas (10%) y otros agroquímicos (17%) (Malakof y Stokstad, 2013).

El valor del mercado global de pesticidas es de 45 billones de dólares estadounidenses por año (FAOStat, 2013, OECD, 2013). Hasta el año 2012, los mercados más grandes están en Europa y Asia (12 billones de dólares estadounidenses cada uno), América Latina (10 billones de dólares estadounidenses) y Norteamérica (9 billones de dólares estadounidenses), en el mercado en el Oriente Medio y África es 1,5 billones de dólares estadounidenses. La síntesis química de pesticidas entrañan un coste enorme; se ha estimado que los costes para traer un solo ingrediente activo al mercado son 250 millones de dólares estadounidenses, habiendo sintetizado 140.000 compuestos para encontrar cada éxito (Lamberth et al., 2013). China, Estados Unidos y Argentina ahora representan el 70% del uso mundial de pesticidas en la agricultura (2,44 billones de kg de ingredientes activos anuales). Seis países consumen entre 50 y 100 millones de kg (Tailandia, Brasil, Italia, Francia, Canadá y Japón) y trece entre 10-50 millones de kg (India, España, Alemania, Bangladesh, Turquía, Sudáfrica, Rusia, Chile, Vietnam, Reino Unido, Ghana, Camerún, y Paquistán).

Los pesticidas representan un problema ambiental y de salud muy serio (Aktar et al., 2009). Prevenir sus eventuales efectos adversos es mucho más difícil que en el caso de otras sustancias usadas en la industria, por dos motivos fundamentales:

- La aplicación de pesticidas requiere principalmente una dispersión sobre amplias áreas (millones de hectáreas de suelo).
- Requiere, además, el uso de concentraciones capaces de matar especies seleccionadas de plantas y animales.

Los pesticidas se introducen en el ambiente con la intención explícita de ejercer su toxicidad sobre uno o más organismos diana, pero, desafortunadamente, esta toxicidad no se limita al lugar donde se aplica el pesticida, sino que estos agentes contaminantes alcanzan

otros compartimentos ambientales, como los ecosistemas acuáticos, a través de diversos procesos físicos de transporte, afectando negativamente a organismos no diana presentes en estos lugares (Cerejeira et al., 2003, Deneer, 2000, Warren et al., 2003). A elevadas concentraciones, algunas de estas sustancias pueden causar la muerte de animales o plantas. Pero también bajas concentraciones pueden acumularse progresivamente a lo largo de la cadena trófica, llegando a causar daños crónicos, especialmente en los niveles superiores, entre los cuales se encuentra el hombre.

La Unión Europea ha demostrado su preocupación sobre los efectos ambientales adversos de los pesticidas, regulando el registro de estas sustancias y su colocación en el mercado, para lo que se establece la obligación de realizar ensayos previos de los potenciales efectos negativos de los ingredientes activos sobre organismos no diana (EEC, 1991). La directiva europea de pesticidas (*Directive 1107/2009*), la directiva REACH (*Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals*, EC, 2006) , la directiva WFD (*Water Framework Directive*, EC WFD, 2000) y la directiva MSFD (*Marine Strategy Framework Directive*, EC MSFD, 2008), son las principales piezas de la legislación Europea donde se expresa la preocupación por la presencia de químicos en el medio ambiente y en el que se reconoce la necesidad de generar una base de datos ecotoxicológicos sobre estos agentes químicos (Gregorio y Chèvre, 2014, Segner, 2011, Storck et al., 2017).

Dentro de los pesticidas, los herbicidas son diseñados para proteger los cultivos, estando dirigidos específicamente a la eliminación de las malas hierbas. La introducción masiva de herbicidas en los campos puede generar efectos adversos en los ambientes naturales. De este modo, resulta de vital interés conocer el efecto de estos pesticidas sobre especies no diana (Saladin et al., 2003).

Los herbicidas pueden ejercer su toxicidad de manera muy diferente: alteración de la estructura y funcionamiento de cloroplastos (biosíntesis de pigmentos fotosintéticos, transporte electrónico fotosintético, formación fotosintética de NADPH y de ATP, inhibición de la biosíntesis de aminoácidos y de lípidos), interferencia en la división celular, inhibición de la biosíntesis de celulosa, alteración del crecimiento celular inducido por auxinas (Wakabayashi y Böger, 2004). Los efectos fitotóxicos de un herbicida incluyen también el bloqueo del transporte electrónico en la mitocondria, interfiriendo en la respiración, e inhibiendo la transpiración (Guanzon y Nakahara, 2002). A pesar de esta gran variedad de mecanismos de acción, se sabe que alrededor del 60% de los herbicidas convencionales interfieren en el sistema de transporte electrónico de la fotosíntesis (Powles et al., 1997, Wakabayashi y Böger, 2004).

Dentro de los herbicidas que tienen como diana la fotosíntesis, las triazinas fueron descubiertas como herbicidas en 1952, por la firma suiza J.R. Geigy *Limited*. Son herbicidas persistentes, que pueden administrarse en grandes concentraciones (5-20 kg ha⁻¹) (Cremllyn, 1991). Estos herbicidas se utilizan ampliamente en Europa, pero debido a las preocupaciones ambientales, algunas triazinas están prohibidas (como atrazina y simazina) por la Comisión Europea, 2003 (EC SANCO/10496/2003-final y EC SANCO/10495/2003-final). Sin embargo, estos herbicidas siguen siendo detectados en el medio ambiente junto con las triazinas en uso hoy en día, como la terbutilazina (Loos et al., 2009, Ma et al., 2002). Esto es debido a su largo tiempo de retención en el suelo y en los acuíferos, que conduce a su perdurable lixiviación y a la presencia de altos niveles de estos contaminantes en diferentes ecosistemas incluso años después de su prohibición (Lorente et al., 2014).

Dentro de los herbicidas tipo triazina para este estudio se ha elegido el herbicida atrazina (AZT) (Fig. 1), que es uno de los contaminantes orgánicos más frecuentes encontrados en los suelos agrícolas y en las aguas subterráneas y de superficie debido a su uso a nivel mundial (Vonberg et al., 2013).

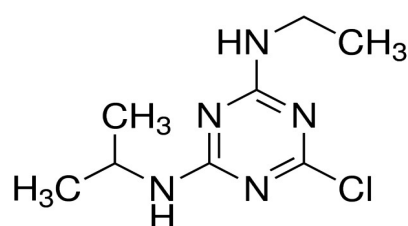


Figura 1. Estructura química de la atrazina (AZT)

(<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/atrazine21568191224911?lang=es®ion=ES>).

Debido a su uso generalizado, persistencia y movilidad es detectado con frecuencia en suelos y en aguas de superficie (Hayes et al., 2010) en concentraciones que oscilan entre los 0,1 y 30 µg L⁻¹, aunque normalmente las concentraciones detectadas están próximas a los 10 µg L⁻¹ (Huber, 1993, Solomon et al., 1996, US EPA, 2012), encontrándose concentraciones más altas en algunos lugares de América donde se exceden los 38,6 µg L⁻¹ (US EPA, 2011). Como se ha comentado anteriormente, la atrazina está prohibida en Europa desde el 2004, pero sigue siendo uno de los herbicidas más ampliamente utilizados en el mundo (Flynn y Spellman 2009), por ejemplo en Estados Unidos y China se aplican anualmente sobre 36.000 y 500 toneladas, respectivamente (Bai et al., 2015, Graymore et al., 2001, Song et al., 2009). La

ATZ tiene un tiempo medio de vida largo, y aproximadamente entre el 20-70% permanece en el suelo después de su aplicación (Assaf y Turco, 1994).

La AZT pura es un polvo blanco sin olor, no muy volátil, reactivo o inflamable cuya nomenclatura IUPAC es 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina. Su peso molecular es 215,68 g mol⁻¹ y su fórmula molecular: C₈H₁₄ClN₅. Su punto de fusión es 173-177°C. Este herbicida es fácilmente soluble en solventes orgánicos y soluble en agua hasta una concentración de 33 mg L⁻¹ a 20°C (Suresh Kumar et al., 2014). Al calentarla se descompone produciendo humos tóxicos, conteniendo cloruro de hidrógeno y óxidos de nitrógeno.

Es un herbicida selectivo y de contacto que es absorbido principalmente por raíces (el movimiento por dentro de las malezas es xilemático) y, en mucha menor medida, también por las hojas. Se utiliza principalmente para el control de malas hierbas de hoja ancha y la mayoría de monocotiledóneas y dicotiledóneas anuales asociadas a cosechas de caña de azúcar, maíz, piñas, sorgo y en ciertos tipos de nueces (Soltani et al., 2011). También se usa en fincas que producen pinos y en áreas usadas para reforestación con pinos. Además se ha usado para prevenir el crecimiento de hierbas a lo largo de carreteras y líneas ferroviarias. La atrazina puede ser rociada sobre cosechas antes de que las cosechas empiecen a crecer y después de que han emergido del suelo. Entre los nombres registrados de la atrazina se incluyen Aatrex®, Aatram®, Atratol® y Gesaprim®.

Como se ya se ha comentado anteriormente, la inhibición de la fotosíntesis es el efecto primario de los herbicidas tipo triazina, específicamente la inhibición del fotosistema II (PSII). La atrazina afecta a la fotosíntesis de la planta mediante el bloqueo de la proteína aceptora de electrones del PSII, inhibiendo la transferencia de electrones en el proceso de fotosíntesis (Qian et al., 2008, Qian et al., 2014) (Fig. 2). La atrazina se enlaza con la proteína D1, con lo que desplaza a la plastoquinona (PQ) de su sitio de unión (el sitio de Q_B) en la proteína D1. Al inhibirse el enlace de la plastoquinona a la proteína D1, el proceso de transferencia fotosintética de electrones es interrumpido y por lo tanto la síntesis de ATP y NADPH en el cloroplasto se ve afectada. Esto provoca una incapacidad para la fijación de CO₂, necesaria para la producción de los carbohidratos indispensables para que la planta pueda sobrevivir (Cid et al., 1995a, Florita et al., 2013, Gao et al., 2011). La interrupción en la transferencia de electrones causa además un estrés oxidativo por la generación de radicales libres que producen daños celulares rápidamente (Mofeed y Mosleh, 2013, Qian et al., 2009).

Este herbicida induce efectos perjudiciales en los ecosistemas acuáticos y alteraciones en la estructura de las comunidades que habitan en los mismos (Choi et al., 2012, Didur et al.,

2012, Sjollem et al., 2014, Weiner et al., 2004). Además diferentes estudios han demostrado que la atrazina afecta al sistema endocrino, nervioso, inmune y reproductivo de los humanos (Liu et al., 2014).

Además, este herbicida puede ser volatilizado a la atmósfera (Gisr et al., 1994, Starr y Goltfelty, 1990) y posteriormente devuelto a la tierra con las lluvias. Como consecuencia puede llegar al agua de los ríos, aguas subterráneas y lagos, donde será relativamente más persistente (Solomon et al., 1996) ya que su degradación en este tipo de ambientes es mucho más lenta. De hecho, es común encontrar restos de este herbicida en muestras de agua que se encuentran cerca de zonas agrícolas (Al-Wabel et al., 2010, Booij et al., 2015, Gaynor et al., 1998, Lorente et al., 2014).

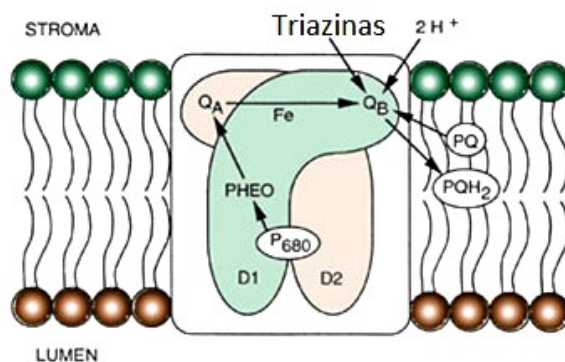


Figura 2. Mecanismo de acción de las triazinas. Interrupción del flujo de electrones en el fotosistema II (PSII) cuando el herbicida desplaza una plastoquinona (PQ) de su sitio de unión con la proteína D1 (Q_B) del fotosistema II (PSII)

(https://www.btny.purdue.edu/WeedScience/MOA/Photosynthetic_Inhibitors/text.html).

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios realizados indican que la atrazina tiene efectos adversos, tanto bioquímicos como fisiológicos en diversos organismos (Bai et al., 2015, Brain et al., 2012, Chalifour y Juneau 2011, Dibur et al., 2012). Además algunos informes han demostrado también que dicho herbicida causa recombinación homóloga del DNA (Besplug et al., 2004) y altera la expresión génica (Lu et al., 2013, Zhang et al., 2012).

Dada su reciente catalogación como una nueva sustancia peligrosa y prioritaria en los medios acuáticos por la Unión Europea (Directiva 2013/39/CE) es imperativo evaluar los riesgos ambientales de la atrazina, incluyendo sus efectos sobre los organismos no diana, utilizando por ejemplo los bioensayos microalgales.

1.3. Bioensayos con microalgas

El conocimiento cada vez mayor de los efectos perjudiciales de la contaminación sobre el ambiente ha hecho cambiar la estrategia tradicional de búsqueda de métodos de restauración o recuperación ambiental hacia una estrategia de prevención de la entrada de potenciales contaminantes en el medio. Con este cambio de actitud, surge la necesidad de métodos para predecir la toxicidad de las diversas sustancias que pueden ser liberadas al ambiente y que pueden ejercer un potencial daño en el ecosistema. Además, hay una demanda creciente de métodos de ensayo cada vez más sensibles (Haglund, 1997). El término ecotoxicología fue acuñado por Truhaut en 1969 (Truhaut, 1977) para definir un nuevo campo de estudio relacionado con los efectos dañinos de los compuestos químicos (toxicología) dentro del contexto de la ecología. Hasta ese momento, el objetivo de la toxicología ambiental había estado centrado en los efectos peligrosos de los compuestos químicos sobre los seres humanos. Sin embargo, la toxicología ambiental, en su sentido más amplio, abarca los efectos de los compuestos químicos no sólo sobre el ser humano, sino sobre los distintos ecosistemas, y esto último sería el objeto de estudio de la ecotoxicología. La ecotoxicología se centra en los efectos perjudiciales de los productos químicos sobre el medio ambiente, abarcando distintos niveles, desde organismos individuales hasta el nivel de población, comunidad o ecosistema.

En la actualidad, las estrategias de ecotoxicología y evaluación de riesgos se basan en un proceso por etapas que ha sido adoptado por ejemplo en el marco de implementación de la normativa REACH de la UE. En este proceso los primeros datos de toxicidad suelen ser de organismos acuáticos y suelen servir para evaluar riesgos tanto para los ecosistemas acuáticos como terrestres a no ser que existan datos concluyentes de la partición del tóxico en suelos o sedimentos. Los estudios de ecotoxicidad más comunes en las últimas décadas para el seguimiento de los contaminantes acuáticos a corto plazo han sido los ensayos de letalidad en peces, los cuales han sido criticados por razones económicas, logísticas y éticas (Fentem y Balls, 1993). Por ello, en la actualidad, los organismos acuáticos utilizados son mayoritariamente algas y el macroinvertebrado artrópodo *Daphnia*; sólo si es necesario se hacen ensayos de toxicidad utilizando peces.

Ante la necesidad de métodos adecuados y eficaces para la evaluación de la toxicidad de los diferentes contaminantes, los microorganismos se han empezado a utilizar como indicadores biológicos de la contaminación en estudios de ecotoxicidad. Los microorganismos son, generalmente, los primeros en ser afectados por las descargas de los diferentes contaminantes en el ambiente o ecosistema, ya que están directamente en contacto con el medio, separados sólo por una membrana y/o pared celular. En base a esto, dichos

compuestos químicos pueden ejercer directamente su efecto sobre ellos, alterando de esta manera la comunidad a la que pertenecen, cambiando el equilibrio entre las especies y alterando las características metabólicas de dicha comunidad (González-Barreiro et al., 2004).

Dentro de los microorganismos, las microalgas se han empezado a utilizar como bioindicadores en estos estudios ecotoxicológicos en el medio acuático, ya que son los principales productores primarios de estos ecosistemas, por lo que cualquier daño que experimenten estos organismos va a repercutir en niveles superiores de la cadena trófica acuática.

El término microalga se refiere a aquellos microorganismos que contienen clorofila *a* y otros pigmentos fotosintéticos, capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica. Dicho término incluye dos tipos celulares distintos: organismos con estructura celular procariota, como son las cianobacterias y organismos con estructura celular eucariota. Por lo tanto, el término “microalga” no tiene sentido taxonómico, ya que dentro del mismo se incluyen organismos con estructura procariota y eucariota. Las microalgas constituyen un grupo muy diverso de organismos fotótrofos que se encuentran en la mayoría de los ambientes, especialmente en los acuáticos, tanto de agua dulce como de agua salada. También se localizan en el suelo, nieve, rocas y en asociaciones simbióticas con hongos, plantas y animales; son, por tanto, organismos ubicuos en la mayoría de los ambientes (Borowitzka y Borowitzka, 1988). Los mares, océanos y aguas continentales contienen enormes cantidades de microalgas, estimándose que el 50% de la fotosíntesis total de la Tierra es realizada por estos microorganismos acuáticos. Se estima que sólo las microalgas fitoplanctónicas fijan varios miles de millones de toneladas de carbono al año en las masas de agua oceánicas y continentales; esto implica además que el oxígeno que sustenta la vida en este planeta se genera principalmente por estos microorganismos. De hecho, estos microorganismos constituyen, en su conjunto, uno de los grupos más efectivos de fijadores de CO₂ del planeta, con rendimientos cinco veces superiores al de los cultivos agrícolas, por lo que contribuyen a paliar significativamente el efecto invernadero (González-López et al., 2011, Ho et al., 2011). Por este motivo, son de gran relevancia para estos ecosistemas, donde contribuyen al balance de oxígeno y con ellas se inicia el flujo de energía, constituyendo los productores primarios más importantes de la biosfera (Gómez, 2007). Para su desarrollo y crecimiento requieren carbono (principalmente CO₂), nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio, hierro y magnesio; así como de otras moléculas inorgánicas y orgánicas complejas, junto con nutrientes traza (Mn, B, Co, Cu, Zn y Mo), los cuales son esenciales puesto que actúan como cofactores enzimáticos en su metabolismo (De Pauw y Persoone, 1988, Vonshak, 1986).

Las microalgas juegan un papel muy importante en el equilibrio de los ecosistemas acuáticos, donde constituyen un componente fundamental del primer nivel de la cadena trófica, como ya se ha comentado anteriormente, de modo que cualquier perturbación, como la toxicidad mediada por xenobióticos, podría alterar la composición específica de la comunidad microalgal y conllevar cambios en los productores secundarios de los ecosistemas acuáticos; estos sucesos podrían alterar la cadena alimenticia y flujo de energía, y producir modificaciones estructurales y funcionales permanentes en los ecosistemas (Campanella et al., 2001, Lürling y Roessink, 2006).

La importancia ecológica de estos microorganismos radica en dos de sus características fisiológicas:

- Su capacidad para captar la luz y utilizar su energía para la asimilación de dióxido de carbono (CO_2) y otros nutrientes inorgánicos a su propia biomasa, constituyendo, por tanto, el primer eslabón de la cadena trófica.
- Su producción de oxígeno (O_2), como subproducto de la fotosíntesis, que representa la mayor parte de la producción total de oxígeno en los sistemas acuáticos.

Hoy en día las microalgas son consideradas como indicadores útiles de la calidad ambiental, gracias a algunas de sus características:

- Son habitantes ubicuos de todas las masas de agua.
- Su representatividad como indicadores de la red fitoplanctónica es innegable.
- Papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos del carbono y del nitrógeno.
- En general, facilidad y bajo coste de mantenimiento de los cultivos microalgales en condiciones de laboratorio.
- Pequeño tamaño.
- Gran facilidad y rapidez de muestreo en los ecosistemas.
- Manifiestan sensibilidad ante un amplio grupo de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos.
- Alta capacidad de bioacumulación de sustancias xenobióticas.

Por todo ello, las microalgas son habitualmente utilizadas en bioensayos de toxicidad en

laboratorio. Estos bioensayos pueden proporcionar una información muy valiosa sobre los efectos de los contaminantes ambientales, de modo que la dirección o asesoramiento ambiental tendrían en estos organismos un temprano y adecuado sistema de alarma que permitiría la toma de decisiones para prevenir tales efectos.

Los bioensayos (test ecotoxicológicos o biotests), se definen como métodos que emplean células vivas, tejidos, organismos o comunidades, para evaluar los efectos producidos por la exposición a productos químicos (Forbes y Forbes, 1994). Estos bioensayos, a su vez, pueden clasificarse en función de su campo de aplicación (condiciones de laboratorio o de campo), niveles de organización biológica o duración de la exposición (Forbes y Forbes, 1994). La historia de los ensayos biológicos se inicia en 1924, cuando Carpenter (Carpenter, 1924) empezó a estudiar la toxicidad de metales pesados en peces en un área con actividades mineras. Los bioensayos con algas se comenzaron a utilizar hace más de tres décadas, y el primer trabajo lo realizó Burrows en 1971 (Burrows, 1971). Estos ensayos de toxicidad con algas han ido cobrando cada vez más importancia, de modo que los ensayos de inhibición del crecimiento algal están incluidos dentro los bioensayos de toxicidad obligados para el registro y notificación de nuevos productos químicos en la Unión Europea (Haglund, 1997, Girling et al., 2000, Pascoe et al., 2000).

Las microalgas verdes de los géneros *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Selenastrum* son frecuentemente utilizadas en ensayos biológicos de la toxicidad de diferentes contaminantes (metales, pesticidas, etc.). En los últimos años se ha establecido la idoneidad de la utilización de cultivos de microalgas para ensayos biológicos y fisiológicos, demostrándose que estos microorganismos son muy adecuados para ensayar los efectos tóxicos de distintos contaminantes utilizando pruebas estandarizadas (ISO 8692, 2012, OECD, 2011). En concreto, el bioensayo microalgal más ampliamente utilizado es el basado en la inhibición del crecimiento de las microalgas *Raphidocelis subcapitata* (antes conocida como *Selenastrum capricornutum*) y *Scenedesmus subspicatus* (ISO 8692, 2012) (Haglund, 1997). También existen muchos trabajos realizados con diversas especies de cianobacterias, siendo *Anabaena*, *Nostoc* y *Microcystis* los géneros más comunes en estos estudios. Se sabe que las algas verdes y cianobacterias son comparativamente sensibles a muchos agentes químicos (Real et al., 2003). Por otro lado, su posición ecológica en la base de las cadenas tróficas acuáticas y sus papeles esenciales en el reciclaje de nutrientes son críticos para todos los ambientes (Källqvist y Svenson, 2003, Sabater y Carrasco, 2001). De ahí que estos organismos hayan sido elegidos para su utilización en estudios de ecotoxicidad. Además, el conocimiento de los procesos de absorción, acumulación y metabolismo de contaminantes por las algas es

importante, pues juegan un papel esencial en el proceso de biomagnificación de estos contaminantes a lo largo de la cadena trófica, que puede conducir finalmente a la mortalidad de peces, aves y mamíferos (Goulding, 1985).

Los bioensayos unialgales llevados a cabo en el laboratorio son los más comunes, y los que normalmente se requieren para evaluar la toxicidad de nuevas sustancias que buscan su entrada en el mercado. Dichos biosensayos con microalgas se utilizan cada vez más para la evaluación de la toxicidad de compuestos químicos potencialmente contaminantes y forman parte de las estrategias recomendadas por la Comisión de la Comunidad Europea y la Agencia para la Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA) para la valoración de los daños de los agentes tóxicos (Petersen y Kusk, 2000). De hecho, se ha demostrado que la utilización de una serie de bioensayos de toxicidad llevados a cabo en el laboratorio con organismos de ensayo adecuados es generalmente suficiente para predecir el riesgo ambiental que suponen los diferentes agentes contaminantes en los ecosistemas acuáticos (Girling et al., 2000, Pascoe et al., 2000). Estos bioensayos se pueden realizar utilizando cultivos estáticos (método *batch*), como los utilizados en el desarrollo de esta tesis, en los que el tóxico se añade al inicio del ensayo y no existe ningún tipo de renovación del medio de cultivo ni regulación de la concentración del agente contaminante, o cultivos continuos, en los que existe una renovación del medio de cultivo a una determinada tasa.

Por otro lado, cada vez se utilizan más las baterías de bioensayos, realizados al mismo tiempo e independientemente con diferentes especies de microalgas pero con el mismo tóxico. Estas baterías permiten así comparar la sensibilidad de diferentes especies microalgales, o incluso de diferentes cepas de la misma especie, a un determinado agente contaminante.

Dado que las diferentes especies de microalgas difieren notablemente en sus respuestas ante agentes tóxicos, los bioensayos realizados con una sola especie microalgal son de limitada aplicabilidad en la evaluación de los efectos de estos contaminantes ambientales sobre las comunidades algales, que están formadas por varias especies con distintas sensibilidades. Sin embargo, estos ensayos de toxicidad han sido el origen de muchos datos biológicos para la evaluación del riesgo de diferentes contaminantes y pueden seguir proporcionando información muy valiosa en este tema (Ma y Chen, 2005).

Existen relativamente pocas especies microalgales que se hayan estudiado para su utilización en ensayos de toxicidad, y las que se usan han sido elegidas por su facilidad de cultivo más que por su sensibilidad a los contaminantes. Por tanto, existe una necesidad de buscar nuevas y más sensibles especies que respondan tanto a agentes estimuladores como

inhibidores del crecimiento.

La mayor parte de los ensayos de toxicidad con microalgas realizados en laboratorio se han realizado con microalgas dulceacuícolas, existiendo relativamente pocos bioensayos que puedan ser calificados como estándar en ambientes marinos (Debelius et al., 2008). Las algas verdes y diatomeas son las microalgas más comúnmente usadas en los ensayos de toxicidad relacionados con el medio marino (Moreno-Garrido et al., 2000). La microalga marina *Phaeodactylum tricornutum* ha sido propuesta por algunos autores como un organismo estándar para los ensayos de toxicidad con agua de mar (Cid et al., 1995a, Cid et al., 1995b, Cid et al., 1996a, Cid et al., 1996b, Cid et al., 1997, Torres et al., 2000).

Así, dentro de estos ensayos de ecotoxicidad se engloba el estudio de los efectos de metales (Abalde et al., 1995, Cid et al., 1995a, Cid et al., 1995b, Cid et al., 1996a, Cid et al., 1996b, Cid et al., 1997, Torres et al., 1997a, Torres et al., 1997b, Torres et al., 2000, Torres et al., 2014), de fitosanitarios (Esperanza et al., 2015, Fernández-Naveira et al., 2016, González-Barreiro et al., 2004, González-Barreiro et al., 2006, Prado et al., 2009a, Prado et al., 2009b, Prado et al., 2011, Prado et al., 2012a, Prado et al., 2012b, Prado et al., 2015, Rioboo et al., 2009, Rioboo et al., 2011), fármacos (Halling-Sørensen, 2000, Kvíderová y Henley, 2005, Lai et al., 2009, Seoane et al., 2014, Seoane et al., 2017, Suzuki et al., 2000) y otros contaminantes emergentes (Debenest et al., 2011, Giraud et al., 2017, González-Pleiter et al., 2017, Sanchez et al., 2015).

En los últimos años y debido a sus numerosas aplicaciones, los desarrollos biotecnológicos para la producción masiva de microalgas han sido significativos en todo el mundo. Pueden ser utilizadas como biofertilizantes (Abdel-Raouf et al., 2012), en la purificación de aguas residuales (Fu y Wang, 2011, Park y Craggs, 2010, Ruiz et al., 2011), como acondicionadores de suelo (recuperación de suelos salinos y calcáreos) (Singh y Dhar, 2010), en la industria cosmética (Spolaore et al., 2006, Stolz y Obermayer, 2005), como alimento en acuicultura (utilizadas en la nutrición de moluscos, rotíferos, fases larvarias de crustáceos y peces) (Bayne et al., 1987), y en diversos productos y suplementos alimenticios (Becker, 1988, Fábregas y Herrero, 1986). Asimismo, se ha puesto de manifiesto la potencialidad de las microalgas para la producción de gran variedad de sustancias, algunas de ellas de elevado valor, como ácidos grasos (Hong et al., 2011, Hong et al., 2012, Li et al., 2010), pigmentos (Cuaresma et al., 2011), vitaminas (Abalde et al., 1991, Fábregas y Herrero, 1990), antibióticos (Benemann y Weissman, 1984, Fábregas et al., 1986), productos farmacéuticos y otros productos químicos de interés (Borowitzka, 1988, 1992 y 1995), así como hidrógeno (Nobre et

al., 2013), hidrocarburos (Niitsu et al., 2012, Sakamoto et al., 2012, Yoshimura et al., 2013) y otros combustibles biológicos (Chen et al., 2012, El-Sheekh et al., 2013)

Sin embargo, las algas todavía están poco representadas como organismos de ensayo en los métodos estandarizados y normalmente recomendados, como se ha comentado anteriormente, y, dado que no existe ninguna especie de microalga que sea siempre la más sensible y ecológicamente representativa, es necesario introducir nuevas especies microalgales que puedan ser utilizadas en bioensayos de toxicidad, de modo que en cada caso se pueda elegir el método más apropiado, teniendo en cuenta la naturaleza del medio acuático que se pretende proteger y los organismos que habitan naturalmente en dicho medio, para que el sentido ecológico de los ensayos realizados en el laboratorio sea cada vez mayor.

La microalga de agua dulce empleada en esta tesis es *Chlamydomonas reinhardtii*. Dicha alga unicelular ha sido usada extensamente en investigaciones de biología molecular y estudios de actividad fotosintética (Harris, 2001). Además recientemente ha ganado importancia en estudios ecotoxicológicos (Fischer et al., 2010, Jamers y De Coen, 2010), debido a que es sensible a diferentes contaminantes, se encuentra comúnmente en aguas dulces y suelos, tiene tiempos de generación cortos, es fácil de cultivar, se puede inducir su reproducción sexual, es haploide (Harris, 1989, 2001) y su genoma está secuenciado (Merchant et al., 2007).

1.4. Parámetros habitualmente estudiados en los bioensayos de toxicidad de pesticidas con microalgas

1.4.1. Estudios de crecimiento, viabilidad y morfología celular

El crecimiento es el parámetro más estudiado en los ensayos de toxicidad con microalgas, de modo que el 95% o más de los trabajos publicados lo incluyen (Corrêa et al., 2009, van Wezel y van Vlaardingen, 2004). Es un parámetro general, que refleja el estado fisiológico de las células (Geoffroy et al., 2007).

El crecimiento microalgal se puede monitorizar directamente mediante el recuento de células en cámaras especiales al microscopio, en contadores electrónicos de partículas o mediante citometría de flujo. También se pueden hacer estimas indirectas del crecimiento, ya que se puede correlacionar con la turbidez del cultivo, el peso seco o la cantidad de clorofila *a* (por fluorimetría o espectrofotometría).

Existen diversos índices, normalmente basados en los resultados obtenidos de densidad celular, que nos permiten cuantificar el efecto del pesticida sobre el crecimiento microalgal,

siendo los más utilizados la tasa de crecimiento (μ) y la concentración efectiva media (EC_{50} , *Median Effective Concentration; Effective Concentration 50%*), que es la concentración de compuesto tóxico que reduce el crecimiento de la población en un 50% (Crompton, 1997, Leboulanger et al., 2001, Tang et al., 1997).

Por otro lado, un método eficaz para determinar la viabilidad celular consiste en medir la fluorescencia de las células teñidas con yoduro de propidio (PI, *Propidium iodide*), mediante citometría de flujo (FCM) o microscopía de fluorescencia. El PI es un fluorocromo que penetra en las células cuando éstas mueren y la integridad de la membrana celular se pierde; este fluorocromo produce fluorescencia roja cuando es excitado con luz azul. De este modo, puede ser usado para discriminar entre células viables no fluorescentes y células no viables fluorescentes (Cid et al., 1996b, Esperanza et al. 2015, Franqueira et al., 2000, Hyka et al., 2013, Prado et al., 2012b, Prado et al., 2015, Rioboo et al., 2009, Seoane et al., 2014).

Además, la exposición de las células microalgales a agentes contaminantes como los pesticidas puede inducir alteraciones en la morfología celular, tanto en lo que se refiere al volumen y forma de las células como a alteraciones producidas a nivel subcelular (cambios en la morfología de cloroplastos o mitocondrias, aparición de inclusiones citoplasmáticas, alteración de las membranas, etc.). Estos cambios estructurales y ultraestructurales se pueden estudiar por medio de la microscopía óptica y electrónica, o bien utilizando la FCM (Rioboo et al., 2002, Yang et al., 2002).

1.4.2. Actividades enzimáticas

La toxicidad ejercida por los contaminantes ambientales se puede reflejar en diversas actividades enzimáticas, que pueden ser inducidas o inhibidas por la presencia del agente tóxico. Generalmente se suelen estudiar actividades enzimáticas relacionadas con mecanismos antioxidantes (catalasa, peroxidasa, glutatión reductasa, etc.), pues los contaminantes ambientales suelen desencadenar un estrés oxidativo que puede inducir mecanismos antioxidativos tanto enzimáticos como no enzimáticos, que de este modo se pueden usar como biomarcadores de la toxicidad (Geoffroy et al., 2003).

También se estudian otras actividades enzimáticas, como la actividad esterasa inespecífica, que se puede utilizar como un indicador del estado físico y metabólico de la célula (Dorsey et al., 1989, Gilbert et al., 1992); para ello, generalmente se utiliza el substrato fluorogénico diacetato de fluoresceína (FDA), que se transforma en el compuesto fluorescente fluoresceína por acción de esterasas intracelulares. Mediante FCM o microscopía de fluorescencia se puede estudiar la fluorescencia resultante de la reacción y se puede

determinar la actividad de estas enzimas (Prado et al., 2012a, Prado et al., 2012b).

Por otro lado, también hay estudios de actividades enzimáticas específicas, como diversos enzimas relacionados con el metabolismo del nitrógeno (Fernández-Naveira et al., 2016, Prado et al., 2009, Singh y Tiwari, 1988).

En el caso de la microalga *Dunaliella tertiolecta*, cuyo crecimiento no es un parámetro particularmente sensible (Abalde et al., 1995), se ha desarrollado un bioensayo de toxicidad de diversos contaminantes basado en la actividad del enzima β -galactosidasa es más sensible que el ensayo tradicional de inhibición del crecimiento; este bioensayo enzimático es rápido, sensible y reproducible, y se correlaciona bien con otros parámetros ecológicamente relevantes como el crecimiento (Peterson y Stauber, 1996).

1.4.3. Actividad fotosintética

Dado que la mayor parte de los pesticidas son herbicidas y una de las dianas más comunes de estos compuestos es la fotosíntesis, el uso de este parámetro fisiológico en los ensayos de toxicidad con microalgas es frecuente. La inhibición de la fotosíntesis refleja rápidamente el efecto tóxico de diferentes contaminantes sobre las microalgas (Macinnis-Ng y Ralph, 2003, Strom et al., 2009).

La actividad fotosintética se puede evaluar mediante diferentes métodos, siendo dos de los métodos más tradicionales la asimilación de CO₂ marcado radiactivamente con ¹⁴C y el seguimiento de la evolución de O₂ por medio de electrodos como el de tipo Clarke.

Desde hace relativamente poco tiempo se ha empezado a utilizar la fluorescencia de la clorofila *a* como un indicador eficaz del estado fisiológico del aparato fotosintético, proporcionando información básica sobre el funcionamiento de la fotosíntesis, y cuyo estudio se puede realizar también por FCM sin necesidad de emplear ningún fluorocromo (Prado et al., 2011, Rioboo et al., 2009, Seoane et al., 2014). Cuando un organismo fotosintético se expone a la luz, se produce una emisión de fluorescencia que se origina principalmente a partir de la clorofila *a* del fotosistema II (PSII). Fotosíntesis y fluorescencia son procesos competitivos, de modo que si células microalgales adaptadas a la oscuridad son iluminadas, la emisión de fluorescencia alcanza rápidamente un valor máximo y empieza a disminuir con el comienzo del transporte electrónico (efecto Kautsky) (Mallick y Mohn, 2003). En condiciones óptimas, la mayor parte de la energía lumínica absorbida por la clorofila es disipada vía conversión química, con una pequeña proporción dedicada a la emisión de fluorescencia y calor, pero la capacidad fotosintética del organismo se puede ver reducida bajo condiciones de estrés, dando lugar a un incremento de la emisión de fluorescencia. Esto se ha observado en el caso de

microalgas expuestas a herbicidas inhibidores del transporte electrónico a nivel del PSII (Eullaffroy y Vernet, 2003).

Comparado con el método tradicional de asimilación de $^{14}\text{CO}_2$, la medida de la fluorescencia de la clorofila *a* para la evaluación de la toxicidad de contaminantes ofrece una serie de ventajas: se realiza rápidamente, de modo no invasivo, sin necesidad de período de incubación, sin efectos botella, sin radiactividad y sin destruir la integridad de las células. Además, se pueden determinar diversos parámetros relacionados con la fluorescencia, que pueden dar una idea del modo de acción primario del agente contaminante (Geoffroy et al., 2003). La cuantificación del contenido de pigmentos por determinación espectrofotométrica también nos puede proporcionar información sobre el estado fotosintético de las microalgas, y de hecho, este parámetro se ha utilizado en varios trabajos como biomarcador de exposición a los herbicidas en las algas (Couderchet y Vernet, 2003, Prado et al., 2009).

1.4.4. Composición bioquímica celular

Los metabolitos pueden considerarse como los productos finales de los procesos regulatorios celulares y sus niveles pueden interpretarse como la última respuesta de los sistemas biológicos a los cambios genéticos y ambientales (Jamers et al., 2009).

Un índice básico muy utilizado es la relación C/N, que se ha relacionado con la tasa de crecimiento de una manera inversamente proporcional (Laws y Chalup, 1991).

Los análisis de la composición bioquímica para caracterizar la respuesta metabólica de un organismo frente a los estímulos o agentes estresantes presentes en el ambiente, han sido poco utilizados hasta la fecha en microalgas. Aun así, diferentes compuestos bioquímicos han sido utilizados como parámetros de estudio en ensayos de toxicidad con microalgas, como el contenido celular de proteínas (Battah et al., 2001), el contenido celular de carbohidratos (Kobbia et al., 2001), el contenido celular de lípidos (Yang et al., 2002) o ácidos grasos (El-Sheekh et al., 2013), o el contenido celular de diferentes pigmentos fotosintéticos, fundamentalmente clorofilas y carotenoides (Couderchet y Vernet, 2003).

1.5. El desarrollo de las “ómicas”

A pesar de que las ómicas son unas tecnologías muy recientes, ya han ocupado una posición importante en el campo de la biomedicina y de la investigación biológica en general, principalmente en esta última década. Estas tecnologías proporcionan gran cantidad de datos que permiten una descripción comprensiva de prácticamente todos los componentes celulares. Los primeros estudios de este tipo se centraron en bacterias y células de mamíferos debido a la

extrema importancia de la información que se obtenía, dirigida a aplicaciones biomédicas o de salud. Sin embargo, otros sistemas, menos conocidos o menos comunes en esta materia, también se han ido sumando gradualmente a este tipo de estudios.

Actualmente, con el desarrollo de la genómica, transcriptómica y proteómica nuevas alternativas surgen para estudiar los efectos de los contaminantes en las microalgas (Jamers et al., 2009) (Fig. 3). Estas ómicas tienen un gran potencial para investigar los mecanismos subcelulares del estrés y las respuestas que afectan al crecimiento y a la fisiología y bioquímica celular.

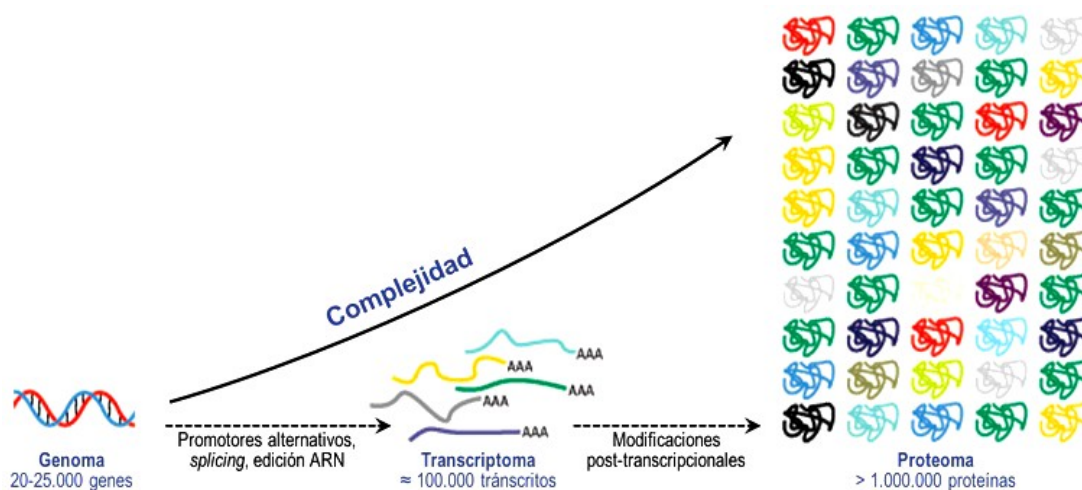


Figura 3. Genómica, transcriptómica y proteómica

(<http://www.innovabiologia.com/biodiversidad/diversidad-animal/evolucion-electroforesis-proteinas/>).

La transcriptómica proporciona información sobre la presencia y la abundancia relativa de transcritos de RNA y ofrece un mejor punto de vista de los componentes activos en la célula que el enfoque genómico (Fig. 3). El estudio del transcriptoma de un organismo en una condición dada puede realizarse con diferentes técnicas; éstas pueden ser basadas en hibridación o secuenciación. Las técnicas basadas en hibridación requieren el conocimiento previo de los transcritos de interés para generar las sondas. Además de esto, introducen ruido por posibles hibridaciones cruzadas, inherente al proceso de diseño de sondas, y limita el rango de detección a genes previamente descritos (McClure et al., 2013, Wang et al., 2009).

En la actualidad, existen varios métodos de determinación de la expresión del RNA mensajero basadas en la hibridación, como el *Northern Blotting*, la hibridación *in situ*, cDNA

arrays y retrotranscripción-amplificación (RT-qPCR) del RNA (Fig. 4), la más empleada en la actualidad.

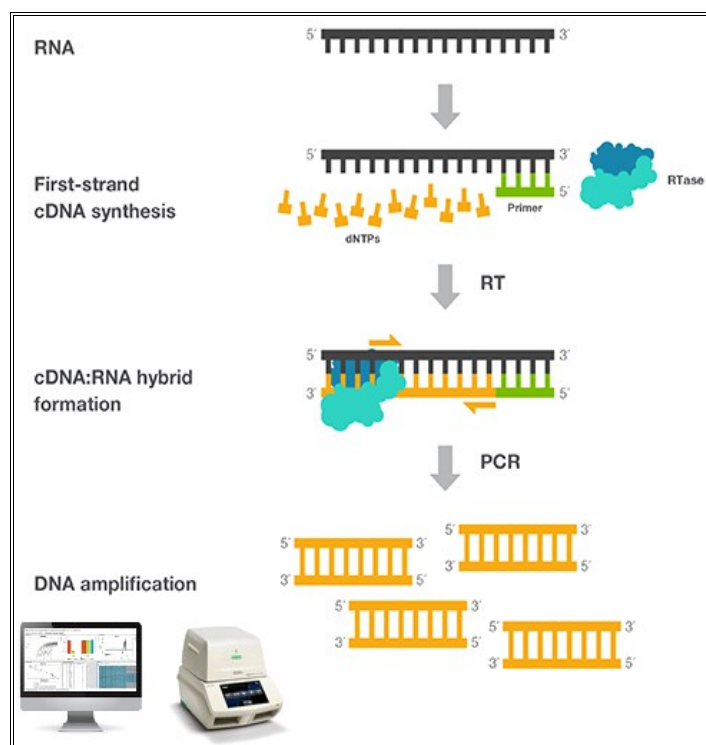


Figura 4. Procedimiento de trabajo utilizando la técnica de RT-qPCR (Imagen modificada de <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-applications.html>).

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcripción reversa (RT-qPCR) es actualmente uno de los métodos más sensibles y exactos para la detección de niveles de RNA mensajeros (RNAm), tanto en células como en tejidos y en el presente trabajo se empleará para el estudio de genes relacionados con los mecanismos antioxidantes. Este método, a diferencia del semicuantitativo, permite la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción, a través del empleo de compuestos con propiedades fluorescentes que sólo emiten fluorescencia cuando el DNA está en forma de doble cadena, de modo que determinando el incremento de fluorescencia se puede determinar la cantidad de producto formado. Este método nos permite seguir la reacción a medida que transcurre a través del incremento de fluorescencia, y nos permite controlar la reacción en todo momento (aumento del nº de ciclos, repetición de ciclos, pausa, etc.).

En el caso de la PCR cuantitativa, el parámetro de medida de la expresión de un determinado gen no es la fluorescencia, sino el ciclo en el que la amplificación comienza a ser exponencial. Este ciclo se denomina ciclo umbral (*threshold cycle*, Ct), pues es a partir del cual la amplificación empieza a ser realmente apreciable. De este modo, los valores de ciclo umbral decrecerán linealmente conforme aumenta la cantidad de cDNA (DNA complementario) de partida, puesto que cuanto más copias de RNAm (RNA mensajero) de partida del gen estudiado haya, más cDNA se obtendrá en la retrotranscripción, y antes comenzará la amplificación a ser exponencial. Así pues, realizando una curva estándar de cantidades de RNAm de partida conocidas, este método permite la cuantificación relativa de la expresión de un gen en función de la expresión de un gen de expresión constitutiva, es decir, que no varía según diferentes condiciones.

Diversos estudios con microalgas mostraron alteraciones en los niveles de transcritos antioxidantes en respuesta a diferentes tipos de estrés, exposición a KCl (Vavilala et al., 2016), a ácidos perfluoroalquilo fosfónicos (Sanchez et al., 2015), a mercurio (Elbaz et al., 2010), a cobre (Jiang et al., 2016), a herbicidas (Bi et al., 2012, Qian et al., 2009), deficiencia de manganeso (Allen et al., 2007).

Por otro lado, las técnicas basadas en secuenciación tienen mayor alcance; técnicas como SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), CAGE (*Cap Analysis of Gene Expression*) y MPSS (*Massively Parallel Signature Sequencing*) se basan en la secuenciación de cDNA, o librerías de ESTs (*Expressed Sequence Tag*) con Sanger. Sin embargo, debido a que estas técnicas son de bajo rendimiento, se requiere dirigir la secuenciación de forma específica para producir resultados precisos, elevando los costes significativamente (McClure et al., 2013, Oszolak y Milos, 2011, Wang et al., 2009).

La aparición de las plataformas de secuenciación masiva paralelizadas, o técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS, *Next-generation sequencing*), ha generado la producción de datos a gran escala. Debido a esto, los costes de secuenciación se han reducido drásticamente de entre dos a tres órdenes de magnitud en los últimos diez años (Shendure y Ji, 2008, Tucker et al., 2008). La reducción en los costes de NGS ha aumentado las posibilidades de estudiar cambios en el campo transcriptómico de forma más flexible y global que lo permitido por técnicas anteriores. El nuevo enfoque de interés en el tema de la transcriptómica es la secuenciación masiva y profunda de RNAs, cuya técnica se denomina RNA-Seq. La secuenciación de transcritos con RNA-Seq es hoy en día una de las técnicas más populares en los estudios transcriptómicos. Relativamente reciente, esta técnica ha permitido la

secuenciación de transcritos de RNA en una escala y profundidad no alcanzada por otras técnicas anteriores. Sin embargo, el alcance de las conclusiones que se pueden sacar depende estrictamente de un proceso adecuado, desde el diseño experimental hasta el análisis bioinformático de los datos. El principal objetivo de RNA-Seq es catalogar todos y cada uno de los transcritos (RNA) expresados por una célula en una condición específica y entender así los procesos celulares, las rutas metabólicas y de regulación, las respuestas a estímulos, etc (Fig. 5). Es una técnica altamente cuantitativa y de alto rendimiento que ha encontrado diversas aplicaciones en la actualidad (Chen et al., 2011, Hoen et al., 2008, McClure et al., 2013, Oszolak y Milos, 2011, Van Verk et al., 2013, Wang et al., 2009). Estas técnicas basadas en secuenciación masiva eliminan el ruido introducido por la correcta hibridación de sondas dependiente del diseño empleado, ofrecen un mayor rango dinámico de detección al evitar la saturación por señales de fluorescencia y permiten obtener un panorama más global de los genes activados y/o reprimidos sin restringirse a genes previamente caracterizados (Bradford et al., 2010, Hoen et al., 2008, Nookaew et al., 2012, Soneson y Delorenzi, 2013, Van Verk et al., 2013).

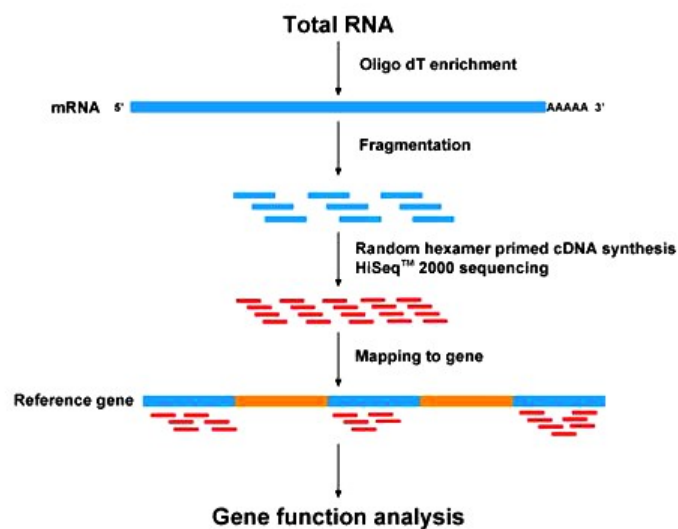


Figura 5. Procedimiento de trabajo utilizando la técnica de RNA-Seq (<http://bio.lundberg.gu.se/courses/vt13/maseq.html>).

A día de hoy existen pocos estudios en los que se emplee esta técnica en microalgas (Bochenek et al., 2013, Hook et al., 2014, Li et al., 2014, von Dassow et al., 2009) y la mayoría de ellos emplean el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (González-Ballester et al., 2010,

Hemschemeier et al., 2013, Ramundo et al., 2014, Yang et al., 2013).

Los avances la ecotoxicogenómica y ecotoxicotranscriptómica han permitido la detección de respuestas a los contaminantes en concentraciones más bajas y durante períodos de tiempo más cortos que en las pruebas tradicionales (Poynton y Vulpe, 2009). También ha permitido la exploración del modo de acción de sustancias tóxicas y efectos de interacción, lo que permite predecir mejor cómo los contaminantes afectarán a organismos en escenarios del "mundo real" (Villeneuve y Garcia-Reyero, 2011). Sin embargo, incluso con el desarrollo de la tecnología de la NGS (Mehinto et al., 2012) en la mayoría de los estudios transcriptómicos todavía se realizan microarrays o RT-qPCR y en muy pocos se ha empleado el RNA-Seq en estudios de ecotoxicología utilizando microalgas como bioindicadores (Hook et al., 2014).

La proteómica es el término empleado para describir la disciplina encargada de estudiar los proteomas (Fig. 3), permite la comprensión de la enorme cantidad y variedad de proteínas que son expresadas por una célula u orgánulo bajo cualquier conjunto dado de condiciones. Proporciona información sobre la expresión génica y su regulación, complementaria a los estudios genómicos y transcriptómicos, sobre la base de la determinación de los niveles de expresión de proteínas, así como la interacción proteína-proteína (Jamers et al., 2009). Por su parte, las proteínas son biomoléculas formadas por secuencias concretas de aminoácidos y son las encargadas de ejecutar las funciones encriptadas por el código genético.

Esta ómica está evolucionando rápidamente para hacer frente a una gama de origen heterogéneo de secuencias de proteínas, información, estructuras, funciones y sus interpretaciones generales e inferencias derivadas. La introducción del término proteoma ocurrió en 1994, hasta mitad de los años 90 se utilizaban los geles en dos dimensiones (2D) y la espectrometría de masas. A partir de 1999 hasta la actualidad surgieron nuevas técnicas que permitieron el avance de esta ómica como las cromatografías líquidas, LC-MS (*Reverse Chromatography-Mass Spectrometry*), SELDI (*Surface-Enhanced Laser-Desorption-Ionization*), DIGE (*Differential Gel Electrophoresis*), MuDPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*), ICAT (*Isotope-Coded Affinity Tag*), AbArrays (*Antibody Arrays*), SILAC (*Stable Isotopic Labeling with Amino acids in Cell Culture*), iTRAQ (*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*), SISCAPA (*Stable Isotope Standards, Capture by Antipeptide Antibodies*). Hoy en día, las bases de datos de proteínas están creciendo a un ritmo acelerado y por ello surge la necesidad de recursos y métodos bioinformáticos más confiables para el estudio de las interacciones y funciones de las proteínas (Diniz et al., 2012).

El proteoma, a diferencia del genoma, es un elemento altamente dinámico, cuyos

componentes varían en cada célula del organismo como consecuencia de la activación o supresión de genes, del procesamiento de los transcritos que codifica el genoma así como de las modificaciones postraduccionales de las diferentes variantes proteicas que a su vez se modulan dependiendo de las condiciones fisiológicas y el entorno. La abundancia de proteína dentro de un proteoma muestra un alto rango dinámico de entre 4 a 6 órdenes de magnitud. Además de las grandes diferencias en la abundancia, las proteínas también muestran diferencias en su estabilidad: algunas tienen vidas medias del orden de minutos, mientras que otras son mucho más estables, con vidas medias de horas o incluso días. Estas propiedades tienen implicaciones en cuanto a la función de una proteína. Las enzimas que se expresan constitutivamente se espera que sean estables y funcionales durante un largo período de tiempo. Sin embargo, las proteínas incluso inherentemente estables pueden cambiar rápidamente cuando están dañados debido a la exposición a condiciones ambientales desfavorables. En contraste, las proteínas que son inherentemente de breve duración son más adecuadas para actuar como proteínas biomarcadoras, ya que una vez que la transcripción y traducción de los correspondientes genes cesa, desaparecen rápidamente. Muchas proteínas dentro de un proteoma son sometidas a una gran variedad de modificaciones post-traduccionales (PTMs) durante toda su vida y varios cientos de tipos diferentes de PTMs se han descrito hasta el momento (Bienvenut et al., 2011).

La proteómica abarca un conjunto de tecnologías de alto rendimiento que nos permiten analizar cientos de proteínas en el mismo ensayo. Es una disciplina que comprende varias áreas de estudio: la proteómica descriptiva o estructural cuyo objetivo es la identificación y caracterización a gran escala de las proteínas en una condición biológica determinada (ej. modificaciones post-traduccionales), la proteómica comparativa o de expresión diferencial que se encarga de identificar los cambios en el nivel de expresión de proteínas asociados a diferentes condiciones biológicas, y la proteómica funcional que se encarga de estudiar la localización distribución subcelular de las proteínas así como sus interacciones. En este trabajo se ha empleado la proteómica comparativa para detectar cambios a nivel de expresión de proteínas cuando se exponen las células microalgales al herbicida atrazina.

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que permite identificar y cuantificar moléculas después de transformarlas en iones cargados. Los analitos se identifican posteriormente por la relación masa/carga (m/z) de sus iones. Los espectrómetros de masas consisten en 3 elementos básicos: una fuente de iones que convierten los analitos en iones en fase gaseosa, un analizador de masas que separa los analitos ionizados basándose en su relación m/z , y un detector que registra el número de iones de cada una de los valores m/z

(Fig. 6) (Hoffmann et al., 2007).

Los espectrómetros de masas fueron utilizados por primera vez para caracterizar proteínas y péptidos a finales de los años 50 (Biemann et al., 1959). La evolución más grande de esta tecnología, se produjo en la década de los 70 y 80, con el desarrollo de los espectrómetros de masas en tándem (Hunt et al., 1981) y las fuentes de ionización. La fuente de ionización se encarga de convertir los analitos en iones gaseosos, una de las fuentes más empleadas en proteómica es la fuente de desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI). En esta fuente de ionización, la muestra se mezcla con una matriz orgánica y se deja cristalizar sobre una superficie metálica. En este caso, la ionización se produce por sublimación de la muestra sólida al incidir un láser sobre la matriz dando lugar a moléculas protonadas en estado gas que son dirigidas hacia el analizador de masas a través de un campo eléctrico (Karas y Hillenkaup, 1988).

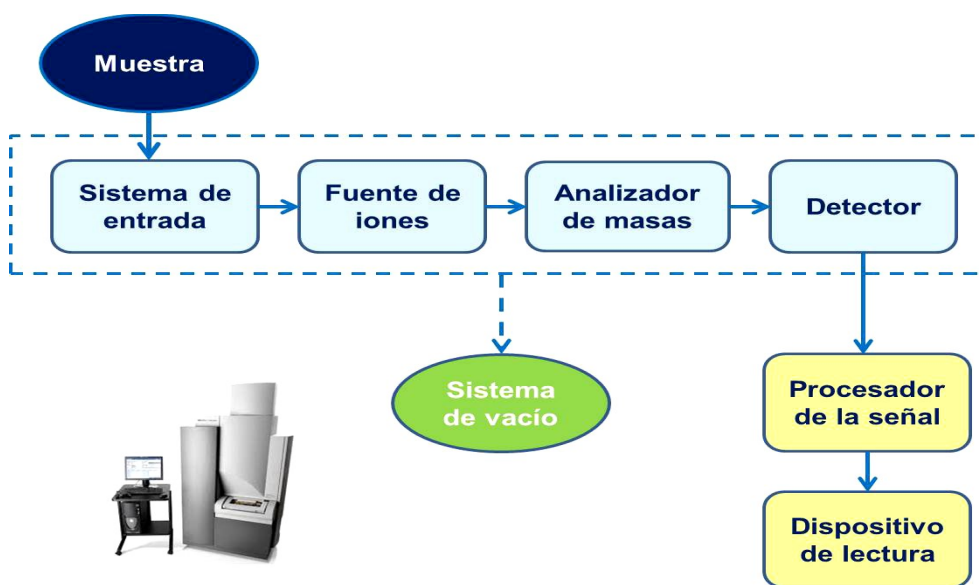


Figura 6. Componentes de un espectrómetro de masas.

El analizador de masas es el elemento más importante de la espectrometría de masas y de sus características depende la sensibilidad, resolución y la precisión para generar información acerca del espectro m/z (MS) y del espectro de fragmentación (MS/MS) de los analitos. Uno de los analizadores empleados habitualmente en la investigación proteómica es el tiempo de vuelo (TOF). Miden la masa de los péptidos intactos y se suelen acoplar a las

fuentes de ionización MALDI. En el TOF los iones son acelerados en el interior de un tubo hasta llegar a un reflector donde los iones son dirigidos hacia un detector. Los iones se separan según diferencias en las cinéticas de los iones y en el detector se mide y cuantifican los iones que llegan de cada una de las m/z (Fig. 6).

A continuación las proteínas se identifican normalmente mediante la estrategia conocida como *bottom up*. En ella las proteínas se desnaturalizan, se separan, se digieren y los fragmentos peptídicos se identifican por espectrometría de masas. El método *bottom up* más habitual para la identificación es utilizar la huella peptídica de la proteína que se corresponde con el espectro de masas (MS) correspondiente a los péptidos que resultan de la digestión enzimática de la proteína. Si el espectro de MS no es suficiente para la identificación de la proteína, se procede a la fragmentación de los péptidos, obteniéndose las masas de los fragmentos en un espectro de masas en tándem (MS/MS) de la proteína. Posteriormente, el espectro de MS o el de MS/MS es volcado mediante un programa informático en una base de datos donde podemos comparar el espectro obtenido con el de espectros de digestión *in silico* (Di Girolamo et al., 2013).

La cuantificación implica la medida de cantidad de proteína existente en una muestra dentro de un rango de magnitudes. En proteómica muchas veces no es suficiente identificar qué proteínas hay en la muestra si no también saber en qué proporción está esa proteína en una condición biológica determinada. La cuantificación puede ser absoluta o relativa, siendo esta última mucho más utilizada en los estudios de proteómica cuantitativa. En las cuantificaciones relativas, la abundancia de las proteínas se mide por comparación entre distintas condiciones biológicas y ha sido la cuantificación utilizada en esta tesis. En muchos casos la cuantificación relativa se lleva a cabo mediante un marcaje metabólico o químico utilizando distintos tipos de isótopos estables que se unen a las proteínas o a sus péptidos. Los péptidos marcados producen, en el análisis de MS o de MS/MS, dependiendo del método de marcaje empleado, parejas de picos con una diferencia de masa característica a la de los isótopos usados. La cuantificación en todos los casos se basa en la comparación de las intensidades de las señales correspondientes a los isótopos utilizados. En este trabajo se utilizó el marcaje químico mediante isótopos estables (iTRAQ).

El reactivo iTRAQ es un marcador isobárico que presenta un grupo reportero, un grupo reactivo y una porción compensadora (Fig. 7A). El grupo reportero presenta una relación m/z que va desde 113,1 a 121,1 en la versión de ocho reactivos, que es la utilizada en este trabajo. Durante la fragmentación de los péptidos marcados, los grupos reporteros se liberan de los

mismos y pueden ser detectados en el espectro de MS/MS como picos con una relación m/z de 113,1; 114,1; 115,1; 116,1; 117,1; 118,1; 119,1 y 121,1 en la versión de ocho reactivos. El grupo compensador equaliza las masas de los distintos reactivos, de manera que la masa total de cada reactivo sea la misma. De esta manera, dado que la suma de los pesos moleculares de las tres partes de cada reactivo es constante, un péptido marcado es detectado como un pico único en el espectro MS, pero, como cada grupo reportero difiere en su peso molecular, los fragmentos originados tras la ruptura de cada marcador se observan como picos distintos en el espectro de MS/MS. Así, la concentración relativa de los péptidos se obtiene por comparación de las intensidades de las señales MS/MS de estos grupos reporteros (Zieske, 2006) (Fig. 7B).

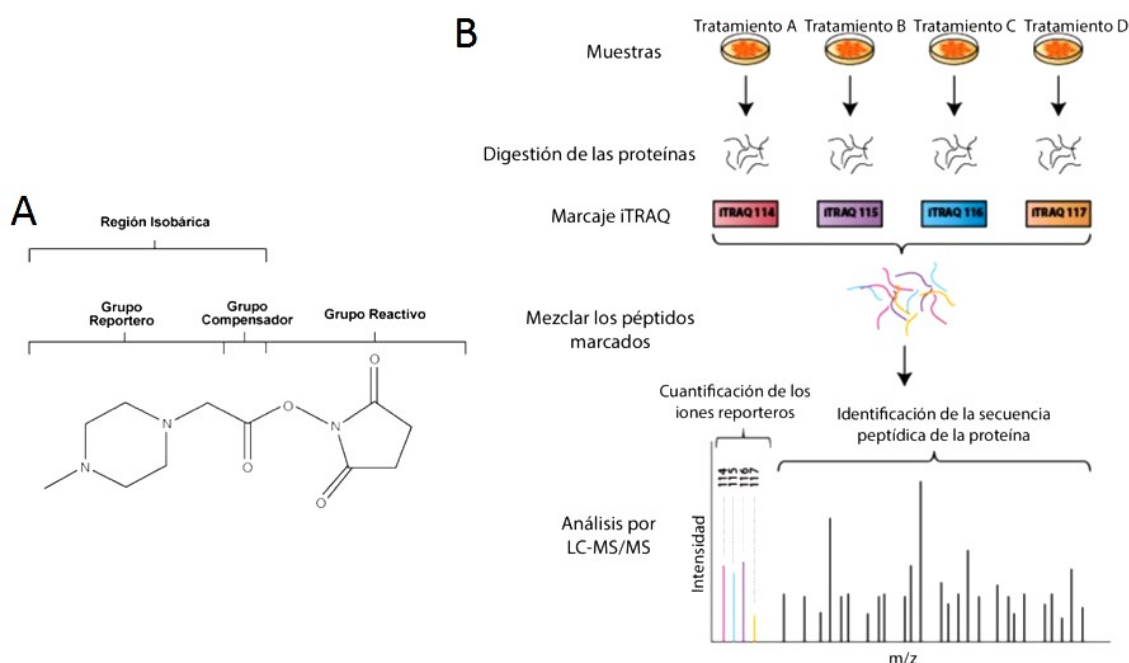


Figura 7. Reactivo iTRAQ (A) y ejemplo de flujo de trabajo en proteómica usando iTRAQ con 4 reactivos (B) (Imagen modificada de <https://sciex.com/community/blogs/blogs/the-history-of-isotopic-labels-for-quantitative-proteomics>).

La proteómica, debido a su amplia aplicación, generó interés en numerosas disciplinas ya establecidas de la biología básica y medicina, pero también se está aplicando a áreas relativamente nuevas como la toxicología. La toxicoproteómica permite estudiar como la exposición de los organismos a los químicos o tóxicos modifica a las proteínas directamente, produce cambios de expresión o provoca alteraciones en las rutas biológicas y en los procesos

que llevan a la toxicidad (Wetmore y Merrick, 2004).

Con respecto al análisis del proteoma en algas, apenas existen trabajos publicados (Ji et al., 2015, Ma et al., 2013) y en su mayoría se centran en el estudio de *C. reinhardtii* (Bienvenut et al., 2011, Diniz et al., 2012, Jamers et al., 2009, Kelle et al., 2005, Schmidt et al., 2006, Stauber y Hippler, 2004, Vener, 2007, Wang et al., 2012, Zaffagnini et al., 2012) y muy pocos de ellos se centran en la toxicoproteómica (Baba et al., 2011, Cid et al., 2010, Förster et al., 2006, Wase et al., 2014).

Además de las ómicas comentadas, en un artículo científico en 2001 (Davies et al., 2001) se utiliza por primera vez el término citómica (*cytomics*). Los citomas pueden ser definidos como el conjunto de los sistemas y subsistemas celulares y los componentes funcionales del organismo. La heterogeneidad de los citomas, resultante de la expresión del genoma y la exposición a factores externos, es abordada por la citómica, definida como el estudio de los fenotipos moleculares de las células individuales en combinación con una exhaustiva extracción informática del conocimiento así obtenido. La citómica como disciplina tiene como objetivo el conocimiento del diseño molecular y la funcionalidad de los citomas mediante el análisis célula a célula, una aproximación que permite evitar la pérdida de información que caracteriza a otras metodologías, que proporcionan valores promedios a partir del análisis simultáneo de números elevados de células o de homogeneizados de tejidos. Conceptualmente, la citómica pone en relación a la tecnología (sistemas de detección y medición) con la biología (estructura y función).

Uno de los objetivos prioritarios en el campo de la evaluación de la contaminación ambiental es el desarrollo de marcadores basados en la respuesta fisiológica de organismos vivos con el fin de agilizar la obtención de datos biológicos que permitan analizar el riesgo que conlleva la liberación al ambiente de compuestos potencialmente contaminantes. En este sentido, la citometría de flujo (FCM, *Flow cytometry*), se presenta como un método alternativo a los parámetros utilizados en ensayos de toxicidad tradicionales, basados fundamentalmente en medidas a nivel poblacional y a un único tiempo final de ensayo, como la inhibición del crecimiento microalgal.

La FCM se caracteriza por ser una técnica rápida capaz de analizar miles de células por segundo y que permite un análisis multiparamétrico de células individuales en suspensión. Mediante la utilización de colorantes fluorescentes químicamente específicos, la FCM puede proporcionar información acerca de las condiciones fisiológicas *in vivo* de las células. En los bioensayos de toxicidad con microalgas se utiliza con el fin de detectar la respuesta de estos

microorganismos a distintos niveles celulares, desde propiedades inherentes a la célula a diferentes parámetros fisiológicos.

Dentro de estos parámetros destacan los indicadores de respuesta rápida mediante el análisis de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular o el potencial de membrana citoplasmática.

Por un lado, el ión calcio tiene un papel muy importante como mediador en la transducción de señales transmembrana y aumentos en la concentración de Ca^{2+} son parte de la regulación de diversos procesos (Tsien et al., 1982). Hasta mediados de los 80, la medida del calcio intracelular se restringía a células grandes de invertebrados donde era posible el uso de microelectrodos (Baudet y Hollingworth, 1994); también se desarrolló la utilización de indicadores bioluminiscentes, como el aquorin, una fotoproteína activada por el calcio (Izutsu y Felton, 1972, Suzuki et al., 2008, Takahashi et al., 1999), que necesitan cargarse en las células mediante microinyección u otro método de disrupción celular, por lo que su aplicación estaba también muy limitada (Rabinovitch y June, 1990). El desarrollo de quelantes de calcio fluorescentes ha permitido una medida fiable de este ión en células de pequeño tamaño (Tsien et al., 1982), y el descubrimiento de moléculas de este tipo cada vez más selectivas y altamente fluorescentes ha abierto las puertas a la aplicación de la FCM para el estudio del calcio intracelular (González-Pleiter et al., 2017, Gryniewicz et al., 1985, Prado et al., 2012b).

Por otro lado, se considera que el mantenimiento de un potencial transmembrana negativo es un mecanismo de control que permite que las células permanezcan en un estado inactivo, de modo que se ha sugerido que cualquier cambio en este potencial de membrana citoplasmático, por ejemplo como consecuencia de la unión de ciertos ligandos a receptores transmembrana, puede ser mediador de la consiguiente respuesta fisiológica celular. El desarrollo de pruebas indicadoras sensibles al potencial de membrana citoplasmático es esencial para estudiar este parámetro fisiológico en células de pequeño tamaño, como las células microalgales, donde es difícil el uso de microelectrodos. Una molécula lipofílica cargada puede servir como un indicador del potencial de membrana ya que se espera que el reparto entre el interior celular y el medio cumpla la ecuación de Nernst (Rabinovitch y June, 1990). Actualmente, el potencial de membrana plasmática puede ser estudiado por FCM gracias a fluorocromos específicos (González-Pleiter et al., 2017, Hyka et al., 2013, Peperzak y Brussaard, 2011, Prado et al., 2012a, Prado et al., 2012b, Seoane et al., 2017).

La FCM también permite el estudio del estrés oxidativo de las células mediante el análisis de especies reactivas de oxígeno (ROS). El estrés oxidativo se define como una

alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Chance et al., 1979). Así pues, el estrés oxidativo puede originarse por un exceso de sustancias prooxidantes, una deficiencia de agentes antioxidantes, o por ambos factores a la vez. Cuando se produce un desequilibrio entre sustancias prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, el resultado es un daño oxidativo, que puede afectar a diversas moléculas, y que puede reflejarse en sus funciones fisiológicas, provocando daños a nivel del DNA, proteínas, carbohidratos, lípidos y en último caso pueden producir la muerte celular (Foyer y Noctor, 2005).

Todos los organismos aerobios producen durante sus procesos metabólicos las denominadas especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species; ROS), que incluyen el ión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Perl-Treves y Perl, 2002). Aunque clásicamente los ROS como bioproductos tóxicos del metabolismo que pueden conllevar a la muerte celular, también se sabe que hoy en día los ROS pueden actuar como mensajeros secundarios involucrados en las rutas de señalización entre compartimentos celulares (Rosenwasser et al., 2014). Debido a que las ROS presentan una vida media muy corta (del orden de 10^{-6} y 10^{-9} s) y concentraciones celulares submicromolares (Tarpey y Fridovich, 2001), pero un amplio abanico de efectos biológicos, su estudio requiere métodos de detección y cuantificación rápidos y muy sensibles, lo que hace de la citometría de flujo una técnica idónea para medir la sobreproducción de ROS en microalgas (Adler et al., 2007, González-Pleiter et al., 2017, Jamers y De Coen, 2010, Prado et al., 2012a, Prado et al., 2012b).

La FCM también permite el análisis de ciertos parámetros relacionados con la actividad celular. El metabolismo energético de los eucariotas fotosintéticos se basa principalmente en la respiración celular y la fotosíntesis que ocurre en la mitocondria y el cloroplasto, respectivamente. En ambos procesos, la transferencia de electrones se produce a través de varios cofactores unidos covalentemente a complejos multiproteicos de enzimas embebidos en las membranas de los orgánulos. Estas transferencias de electrones están acopladas a la generación de un gradiente de protones electroquímicos transmembrana cuya energía es consumida por ATP sintasas para sintetizar ATP de ADP y fosfato inorgánico (Mitchell, 1961). Dicha energía es necesaria para que los organismos puedan realizar sus funciones vitales y al mismo tiempo se puedan defender frente a factores de estrés bióticos y abióticos.

Por lo tanto, además de estudiar el proceso de fotosíntesis es importante estudiar los posibles cambios en la actividad mitocondrial, como el potencial de membrana mitocondrial (Cossarizza y Salvioli, 2001, Esperanza et al., 2015, Prado et al., 2012b, Qu et al., 2001).

Otra de las aplicaciones de la FCM es el estudio de fenómenos de muerte celular programada (PCD). La determinación de la activación de las moléculas que disparan el proceso de apoptosis ha adquirido gran importancia en los últimos años. Tal es el caso de las caspasas, que son una serie de cistein-proteasas que se encuentran en forma de zimógeno en todas las células. En las células de mamíferos, un tipo de PCD, comúnmente referido como apoptosis, es a menudo mediado por una cascada enzimática de caspasas (Sanmartin et al., 2005) que da como resultado un fenotipo típico de encogimiento y contracción del citoplasma, condensación de la cromatina y rotura oligonucleosomal del DNA en fragmentos de 180 pb (Kerr et al., 1972). Las caspasas relacionadas con la PCD, pueden clasificarse en 2 tipos: caspasas iniciadoras y ejecutoras. En humanos las caspasas 3 y 7 han sido descritas como las principales caspasas ejecutoras, ya que se caracterizan por una actividad altamente específica en comparación con el resto de caspasas conocidas hasta ahora (Ledvina et al., 2016, Van Aken y Van Breusegem, 2015).

Aunque no se han identificado genes ortólogos de caspasa en los genomas de plantas, la presencia de una actividad parecida a la caspasa se ha reportado en varios procesos de PDC en plantas y algas (Bonneau et al., 2008, Moharikar et al., 2006, Zuppini et al., 2007), pero las funciones y actividades celulares de estas enzimas siguen siendo una cuestión abierta en los organismos unicelulares (Zuppini et al., 2010).

Por todo ello se puede decir que las técnicas de procesamiento de datos relacionados con las tecnologías ómicas proporcionan herramientas que pueden ser de gran valor en la investigación ecotoxicológica (Spurgeon et al., 2010).

2. Objetivos

Toxicidad ejercida por
contaminantes acuáticos sobre
microalgas de agua dulce



A la vista de lo expuesto anteriormente, se plantea como objetivo general de este trabajo, la evaluación de los potenciales efectos tóxicos producidos por la atrazina en las células de la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii*, basándonos en las alteraciones de diferentes componentes o procesos celulares y su potencial interacción entre sí. Este objetivo general puede concretarse en los siguientes objetivos:

1. Estudio mediante citometría de flujo de las alteraciones citómicas producidas
2. Detección y análisis de los cambios producidos en el transcriptoma celular entre células control (no expuestas a herbicidas) y células afectadas por el herbicida
3. Detección y análisis de los cambios producidos en el proteoma celular entre células control (no expuestas a herbicidas) y células afectadas por el herbicida
4. Estudio de fenómenos de muerte celular y senescencia

El análisis de todos los parámetros evaluados permitirá determinar su aplicabilidad en estudios ecotoxicológicos con esta microalga. Adicionalmente, la identificación, caracterización y evaluación de los efectos de un herbicida sobre algunos de los parámetros específicos considerados debería posibilitar la definición, establecimiento y sistematización de marcadores específicos de contaminación acuática. El desarrollo de dichos marcadores de contaminación es un objetivo que se considera prioritario en distintos planes de la Unión Europea dirigidos a preservar el medio ambiente, lo que podría contribuir, además, a la elaboración de nuevas directrices para un uso más racional y menos agresivo para el entorno de este tipo de compuestos.



3. Materiales y métodos

Toxicidad ejercida por
contaminantes acuáticos sobre
microalgas de agua dulce



3.1. Descripción de *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard

La especie utilizada en el presente estudio es *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard. La cepa utilizada (CCAP 11/32A mt+) se ha obtenido de la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos (CCAP; *Culture Collection of Algae and Protozoa*) del Laboratorio Marino de Dunstaffnage (Escocia, Reino Unido) y del Centro de Cultivos Ficológicos Canadiense (Toronto, Canadá).

El género *Chlamydomonas* se incluye en la división *Chlorophyta*, y dentro de esta se encuadra en la clase *Chlorophyceae*, orden *Volvocales* y familia *Chlamydomonadaceae*, según la clasificación de Bold (Bold y Wynne, 1985). Sin embargo, estudios filogenéticos basados en el análisis de secuencias de DNA han demostrado que esta familia comprende múltiples linajes filogenéticos que no se corresponden con los géneros definidos morfológicamente, y que algunas especies de *Chlamydomonas*, como es el caso de *C. reinhardtii*, están mucho más relacionadas con algas coloniales del orden *Volvocales* que con otras especies unicelulares incluidas tradicionalmente dentro de la familia *Chlamydomonadaceae* (Harris, 2009).

Las algas verdes unicelulares clasificadas dentro del género *Chlamydomonas* comparten un plan corporal básico, aunque la forma y tamaño celular pueden variar bastante de unas especies a otras, así como la forma y posición relativa del cloroplasto. Este plan corporal básico consiste en una estructura claramente polar, con un par de flagelos apicales, situados en el polo anterior de la célula, y un único cloroplasto basal rodeando a uno o más pirenoides (Fig. 8).

Las células de *Chlamydomonas* tienen forma ovoide, elipsoidal o esférica, con un tamaño que oscila entre 9 y 12 μm de longitud y entre 4 y 8 μm de diámetro.

Las células están rodeadas por una pared, excepto en la zona donde emergen los flagelos (Fig. 8). La pared celular que rodea a las células de *Chlamydomonas* y géneros relacionados es bastante inusual, por el hecho de que consta solo de glicoproteínas fibrosas y no contiene polisacáridos, a diferencia de la pared celular de la mayoría de las otras algas. La fracción proteica es rica en hidroxiprolina, mientras que la fracción de carbohidratos consta principalmente de galactosa, arabinosa, glucosa y manosa (Harris, 2009). En esta pared celular se pueden distinguir tres capas, aunque el grosor varía de unas especies a otras: una capa central granular entre dos matrices cristalinas altamente ordenadas de subunidades glicoproteicas. Algunas especies presentan una cubierta mucilagínosa externamente a la pared celular.

En el polo anterior de la célula existe un engrosamiento nodular de la pared celular que

recibe el nombre de papila apical, a cada lado de la cual la pared es atravesada por dos canales a través de los cuales se proyectan los flagelos (Harris, 2009). Las células de *Chlamydomonas* son isocontas, es decir, que sus dos flagelos son similares en estructura y longitud, con un grosor de unos 0,3 μm (Fig. 8). Internamente, los flagelos son complejos y parecidos a los de otros eucariotas, de modo que muchos de los conocimientos sobre el flagelo eucariota se basan en estudios realizados con *Chlamydomonas*.

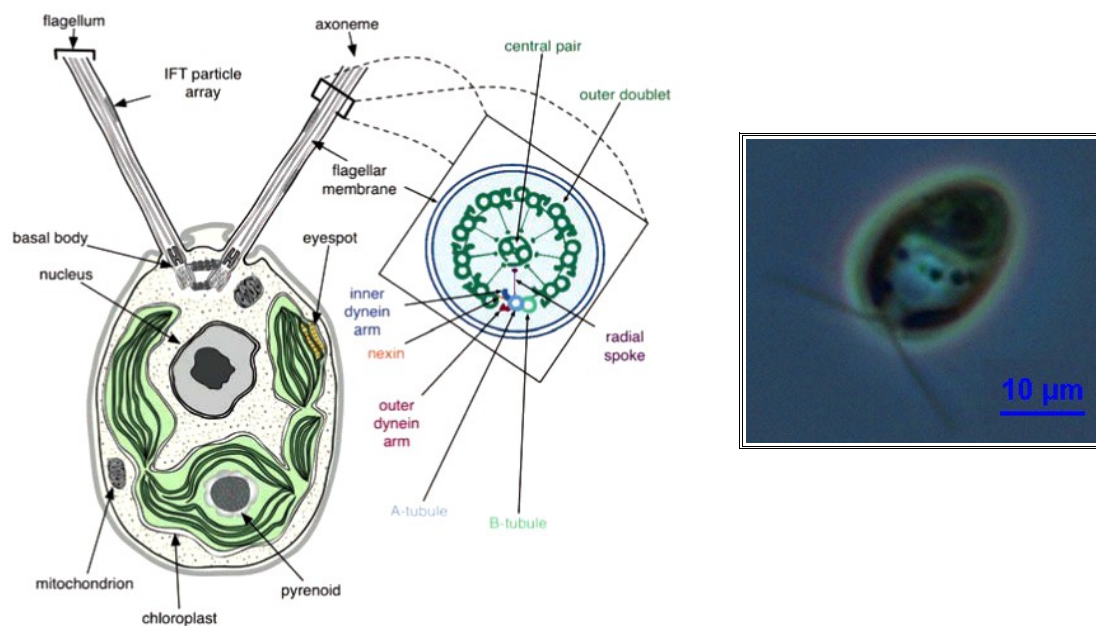


Figura 8. Esquema de una célula *Chlamydomonas* donde se observan: flagelos enraizados en los cuerpos basales y presencia de partículas por el transporte del intraflagelar (IFT) entre el axonema y la membrana flagelar, cloroplasto basal en forma de copa, núcleo central, mitocondria y otros orgánulos. También se representa una sección ampliada del axonema flagelar, con nueve dobletes exteriores y el par central de microtúbulos (9+2), las subestructuras del axonema están codificadas por colores y etiquetadas (Imagen izquierda) (Merchant et al., 2007). Célula de *Chlamydomonas reinhardtii*. La imagen fue tomada con un microscopio Nikon Eclipse E400 (Imagen derecha).

En la mayoría de las especies, el cloroplasto tiene forma de copa y es parietal. En la zona basal del cloroplasto se encuentran uno o más pirenoides. El pirenoide es claramente el centro de producción de almidón en la célula; de hecho, suele estar rodeado por acúmulos de este polisacárido (Fig. 8). La mayoría de las especies presentan, también en el cloroplasto, una mancha ocular o estigma, que aparece como una mancha roja y normalmente alargada situada

inmediatamente bajo la cubierta del cloroplasto, hacia un lateral de la célula (Harris, 2009).

El cloroplasto suele rodear parcialmente el núcleo, que suele estar situado en el centro de la célula, con un nucleolo bastante prominente (Fig. 8). El aparato de Golgi se sitúa con frecuencia alrededor del núcleo, y a su vez suele estar rodeado por un sáculo de retículo endoplasmático que conecta con la membrana nuclear. En la mayoría de las especies, las mitocondrias se encuentran entre el cloroplasto y el plasmalema, y también en la región central de la célula (Fig. 8). Es frecuente encontrar dos vacuolas contráctiles en el polo anterior de la célula, justo bajo los dos cuerpos basales de los flagelos (Fig. 8) (Harris, 2009).

Todos estos rasgos son apreciables al microscopio óptico, y constituyen la base para la diferenciación de especies. Así, las principales características que permiten diferenciar entre especies son la forma y tamaño celular, la forma de la papila apical, la presencia o ausencia de vacuolas contráctiles y el número de ellas, la forma y posición del cloroplasto o el número de pirenoides (Van den Hoek et al., 1995).

El género *Chlamydomonas* es muy amplio, abarcando más de 600 especies. Las especies del género *Chlamydomonas* tienen una amplia distribución (Bishoff, 1959), no solo en aguas dulces y hábitats marinos, sino también en el suelo (Hilton y Trainor, 1963) y en la atmósfera (Brown et al., 1964). Habitan en áreas tanto templadas como tropicales, y también se han encontrado especies árticas y alpinas, así como especies simbióticas asociadas con foraminíferos (Pawłowski et al., 2001). Como se ha mencionado antes, muchas de las especies del género *Chlamydomonas* se encuentran en aguas dulces o en suelos húmedos, existiendo relativamente pocas que habiten en el medio marino. En el caso de *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard, se trata de una microalga de agua dulce.

En condiciones inductoras apropiadas, las células vegetativas de *Chlamydomonas* pueden diferenciarse en gametos (+) o (-). Todos los gametos producidos por las células vegetativas de *Chlamydomonas reinhardtii* son idénticos morfológicamente. Para evitar la reproducción sexual, en nuestros cultivos solo se han utilizado células del tipo mt+. La reproducción asexual tiene lugar por división longitudinal del protoplasto y normalmente se producen dos divisiones celulares sucesivas, dando lugar a cuatro células hijas.

Chlamydomonas reinhardtii tiene un genoma nuclear compuesto por 17 cromosomas con un tamaño total aproximado de 120 Mbp, un genoma cloroplástico de aproximadamente 203 kbp y un genoma mitocondrial de ~16 kbp (Merchant et al., 2007, Storms y Hastings, 1977).

Cuando las células crecen en condiciones de escasez de agua o nutrientes o cuando se ven amenazadas por rotíferos, pueden pasar a un estado palmeloide, formándose grupos de células en número variable que se mantienen juntas al estar rodeadas por un mucílago común (Lurling y Beekman, 2006).

El género *Chlamydomonas* es muy utilizado en investigación biológica, sobre todo en estudios de genética molecular gracias a algunas de sus características: haploide, facilidad de cultivo, crecimiento rápido y posibilidad de inducir la reproducción sexual.

3.2. Cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*

Los cultivos de *C. reinhardtii* se realizan en medio TAP (*Tris-acetate-phosphate*) inorgánico, (Gorman y Levine, 1965, Harris, 2009), con algunas modificaciones, como la ausencia de una fuente orgánica de carbono en el medio y la utilización de nitrato como fuente de nitrógeno. Para su preparación se hacen por separado dos soluciones para luego proceder a su mezcla y así obtener el volumen final de interés.

La primera solución a preparar es el TAP sales (macronutrientes):

NH ₄ Cl	10 g L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4 g L ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2 g L ⁻¹

La segunda solución a preparar es la solución de fosfatos:

K ₂ HPO ₄	288 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	144 g L ⁻¹

De la solución TAP sales se añaden 25 mL L⁻¹ y de la solución de fosfatos 0,375 mL L⁻¹, a continuación ajustamos el pH a 7,0 con HCl al 37%. El medio de cultivo se realiza en agua destilada y, una vez preparado, se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 min.

Por último a esta mezcla de macronutrientes se le añaden, en condiciones de esterilidad, 3 mL L⁻¹ de una solución *stock* de oligoelementos para dar las siguientes concentraciones finales de micronutrientes:

- Tiamina → 35 µg L⁻¹
- Biotina → 5 µg L⁻¹

- Vitamina B₁₂ → 3 µg L⁻¹
- Citrato férrico → 20 µM
- ZnCl₂ → 1 µM
- MnCl₂.4H₂O → 1 µM
- Na₂MoO₄.2H₂O → 1 µM
- CoCl₂ → 0,1 µM
- CuSO₄.5H₂O → 0,1 µM

Esta solución *stock* de oligoelementos se prepara añadiendo 0,25 g de Algal (Nutrición Avanzada S.A.) en 50 mL de agua destilada; se esteriliza en el autoclave a 120°C durante 20 min, y se almacena a 4°C en oscuridad.

Los cultivos *stock* se realizan en matraces Pyrex de 1 L en condiciones axénicas, sin aireación y se mantienen en agitación constante a 150 rpm mediante agitadores orbitales para evitar que las células sedimenten y que se formen gradientes de luz y/o nutrientes. La iluminación, 100 µmol foton m⁻² s⁻¹, es proporcionada por tubos fluorescentes Philips TLD 36W, aplicada con un ciclo de 12 h de luz, 12 h de oscuridad, en una cámara de temperatura controlada y constante a 22 ± 1°C.

En todas las experiencias de este trabajo, la densidad celular inicial de los cultivos ha sido de 2 x 10⁵ células mL⁻¹ a partir de cultivos *stock* en fase exponencial tardía. Esta densidad fue seleccionada tras realizar estudios previos de crecimiento con distintas densidades celulares iniciales, con el fin de elegir aquel medio y aquella densidad que permitiesen ajustar el crecimiento de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* a una curva sigmoidea que alcanzase la fase estacionaria a la 96 h en cultivos no tratados con herbicida.

En las diferentes experiencias se establecieron cultivos expuestos a varias concentraciones del herbicida atrazina, según se indica en el diseño experimental, bajo las condiciones descritas anteriormente.

También se mantienen cepas en medio sólido en placas Petri, suplementando el medio anteriormente descrito con agar al 1,5% y ajustando el pH con ácido acético glacial.

3.3. Diseño experimental

Para evaluar los potenciales efectos tóxicos de la atrazina sobre la microalga *C. reinhardtii* se prepara un *stock* de dicho herbicida comercializado por Sigma-Aldrich (PM:

215,68). Es un estándar *Pestanal*, adecuado para análisis medioambiental, sometido a análisis de HPLC para comprobar su pureza, superior al 98%.

Antes de cada experimento, se preparan nuevas soluciones de *stock* de atrazina disolviendo el compuesto puro en metanol y filtrándolo después a través de filtros de membrana de 0,2 μm . El volumen que se añade de contaminante nunca excede el 0,05% del volumen final. Una comparación estadística entre los controles con metanol y los controles sin solvente no reveló ninguna diferencia significativa en el crecimiento de algas (*t* - Test; *p*-valor $\geq 0,05$), y por lo tanto todas las pruebas siguientes fueron realizadas usando sólo el control con el solvente. Las concentraciones nominales y efectivas fueron similares tras realizar un análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas (Fernández-Naveira et al., 2016), indicando que no hay diferencias entre ambas concentraciones, por lo que la concentración de atrazina en los cultivos microalgales es estable a lo largo del tiempo.

Los cultivos experimentales se establecieron a partir de un inóculo en fase de crecimiento exponencial y se prepararon, a menos que se especifique lo contrario, en matraces *Pyrex* de 250 mL conteniendo 50 mL de cultivo con una densidad inicial de 2×10^5 células mL^{-1} y se mantuvieron durante un máximo de 96 h. Cada tratamiento se realizó por duplicado. En todos los parámetros analizados, las experiencias se repitieron tres veces de manera independiente y siempre se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones controladas de medio de cultivo, luz, temperatura y aireación ya descritas.

Se han llevado a cabo estudios de crecimiento y de viabilidad de concentraciones crecientes de atrazina (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1 y 2 μM) (Fig. 9) a las 0, 3, 24 y 96 h. Mediante el análisis de estos parámetros se ha obtenido la EC_{50} para el crecimiento a las 96 h (0,25 μM), concentración seleccionada para realizar un estudio más detallado a nivel citómico, transcriptómico y proteómico.

Los puntos de tiempo de análisis (3, 24 y 96 h) también se seleccionaron en base a parámetros estudiados por citometría de flujo realizados con anterioridad. A las 3 h de exposición a atrazina se observaron los primeros cambios en la actividad metabólica, tras 24 h se completa un ciclo luz: oscuridad, estos tiempos de exposición nos permiten hacer un análisis agudo o inmediato y a corto plazo, respectivamente, y tras 96 h se pueden estudiar los efectos del herbicida a largo plazo.

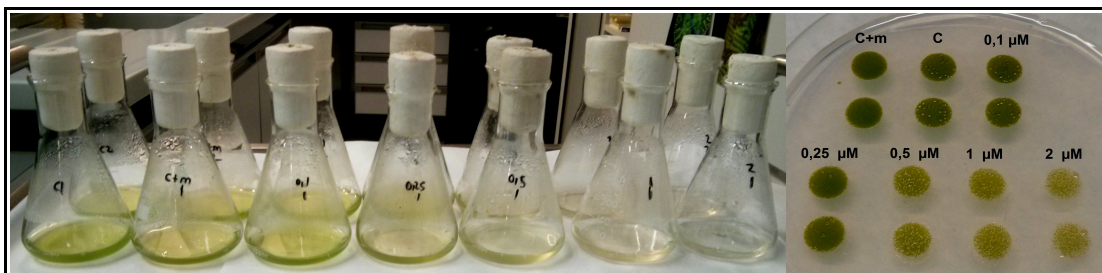


Figura 9. Cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* expuestos a concentraciones crecientes de atrazina durante 96 h en matraces (izquierda) y en placa Petri (derecha).

3.4. Determinación espectrofotométrica de pigmentos fotosintéticos

Para el análisis espectrofotométrico de los pigmentos de *C. reinhardtii*, las células se recogen por centrifugación de un volumen determinado de cultivo en una centrífuga refrigerada ALC PK121R a 8000 g durante 20 min a 4°C. Se retira el sobrenadante y la biomasa se resuspende en un volumen conocido de acetona al 90% (v:v) para extraer los pigmentos, manteniéndola de este modo durante 24 h a 4°C y en oscuridad para que la extracción sea completa. Una vez completada la extracción, se centrifuga de nuevo para retirar los restos celulares, y se recoge el sobrenadante, que contiene los pigmentos extraídos de las células. Con este sobrenadante se realizan lecturas de absorbancia a diferentes longitudes de onda: 664, 647 y 480 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700, frente a un blanco de acetona al 90%. Las mediciones de absorbancia resultantes fueron transformadas a clorofilas y carotenoides según Jeffrey y Humphrey (1975) y Strickland y Parsons (1972), respectivamente. Las ecuaciones utilizadas para el cálculo de las concentraciones de pigmentos en el extracto son:

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

$$\text{Clorofila } b = 20,36 A_{647} - 5,50 A_{664}$$

$$\text{Carotenoides totales} = 4,0 A_{480}$$

dónde las clorofilas *a* y *b* y carotenoides totales representan concentraciones de dichos pigmentos en $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extracto, y A_{664} , A_{647} y A_{480} representan las absorbancias ($DO = \log I_0/I$) medidas a 664, 647 y 480 nm, respectivamente.

3.5. Análisis de *Chlamydomonas reinhardtii* por citometría de flujo (FCM)

La FCM es una técnica que permite determinar un elevado número de propiedades y/o

funciones de células individuales a gran velocidad, pudiendo utilizar una gran variedad de moléculas bioquímicamente específicas, no tóxicas y fluorescentes, en condiciones muy cercanas al estado *in vivo* en exposiciones no prolongadas a niveles de luz muy elevados (Carter y Meyer, 1990).

En un citómetro de flujo el análisis se lleva a cabo haciendo pasar un flujo de partículas (bolas, células, protoplastos, núcleos, cloroplastos, etc.) en suspensión por el punto de enfoque de un haz de láser. La interacción de las partículas con el láser provoca, por un lado, la dispersión de parte de la luz del haz que se recoge por lentes situadas frontal y perpendicularmente respecto al haz y, por otro lado, la emisión de fluorescencia debida a la excitación por el láser de fluorocromos naturales o incorporados a la célula. Esta emisión se recoge por la lente situada perpendicularmente al haz del láser (Shapiro, 1995).

La cantidad de luz dispersada con un ángulo $< 20^\circ$ respecto al haz del láser, que recibe el nombre de luz refractada en el ángulo anterior o *forward scatter light* (FS) es proporcional al tamaño de la célula. Esta dispersión es recogida por un detector de dispersión o fotodiodo. La luz del láser dispersada con un ángulo de 90° es recogida por una lente situada perpendicularmente al flujo de células y al haz de láser. A la cantidad de luz dispersada en un ángulo de 90° con respecto al eje del haz del láser se le llama luz refractada en el ángulo lateral o *side scatter light* (SS) y, en el caso de las células, es proporcional a su complejidad o granularidad intracelular. Esta dispersión lateral es recogida gracias a un espejo dicróico de paso largo a 500 nm situado con un ángulo de 90° respecto al haz de luz. Este espejo dicróico separa la luz del láser dispersada lateralmente, reflejándola hacia su fotomultiplicador, permitiendo solo el paso de la luz fluorescente emitida por la partícula y cuya longitud de onda es superior a 500 nm. A continuación, las diferentes fluorescencias serán separadas y enviadas a su fotomultiplicador correspondiente en función de su longitud de onda, gracias a una combinación de espejos dicróicos y filtros (Fig. 10).

Cuando una célula individualizada pasa frente al haz de láser en un citómetro de flujo produce una señal en fotones con una intensidad determinada; esta señal es detectada por un fotosensor que convierte esta luz en una corriente eléctrica proporcional a la intensidad de la misma. A su vez, esta corriente es preamplificada a un pulso electrónico cuya amplitud es proporcional al número de fotones que originalmente alcanzaron el fotodetector, es decir, a la intensidad de la señal. Estos pulsos son individuales de cada célula y del parámetro biológico que se está determinando. Son proporcionales al ancho de la señal de luz, a la altura o al área integrada de la misma. La amplitud del pulso electrónico se convierte en un número canal.

Estos números canales pueden ser procesados a través de amplificadores lineales o logarítmicos. En la amplificación lineal, el número canal es directamente proporcional a la intensidad de luz provocada por la interacción de la célula con el haz de láser (fluorescencia lineal; FL lin). En una amplificación logarítmica, la señal electrónica de salida convertida en número canal es proporcional al logaritmo de la señal de luz de entrada (fluorescencia logarítmica; FL log). Los resultados de los análisis citométricos se presentan en forma de histogramas de distribución de la población celular con respecto a los parámetros analizados. Estos canales se miden en unidades arbitrarias (u.a.). Esta unidad arbitraria se corresponde con el canal en el que aparece la media de la distribución de datos (histograma) en cada señal (Ormerod, 2008).

El citómetro utilizado en este estudio es un Gallios (Beckman Coulter Inc.), equipado con un láser de argón como fuente de luz, que emite a 488 nm (luz azul). Este citómetro presenta detectores *forward* (FS) y *side* (SS) *light scatter* y 4 fotomultiplicadores o detectores de fluorescencia diferentes en función de la longitud de onda: FL1 (fluorescencia verde, 505- 545 nm), FL2 (fluorescencia amarilla, 560-590 nm), FL3 (fluorescencia anaranjada, 605- 635 nm) y FL4 (fluorescencia roja, 660-700 nm) (Fig. 10).

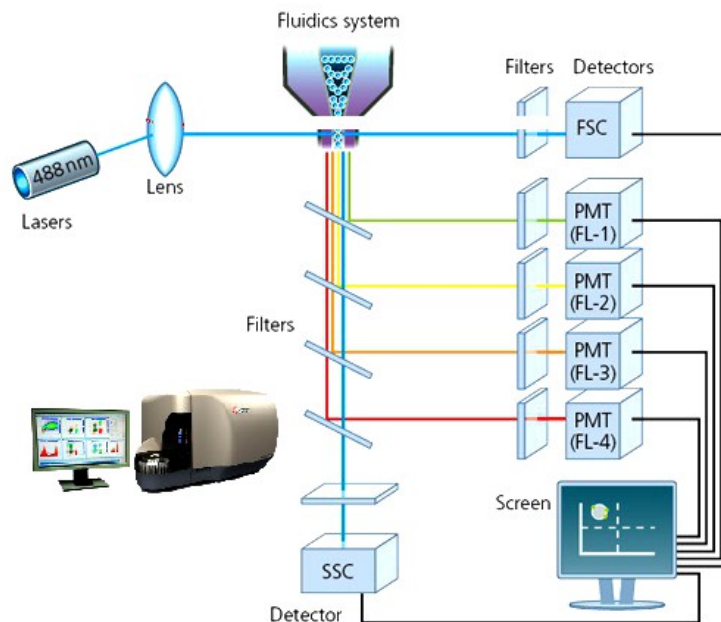


Figura 10. Componentes de un citómetro de flujo
(Imagen modificada de <http://nptel.ac.in/courses/102103016/19>).

La solución utilizada para mantener las células en suspensión y condiciones fisiológicas óptimas es el *IsoFlow*. Para conseguir que en el punto de iluminación pasen las células de una en una, se estableció una velocidad de flujo baja (200-400 contajes por segundo) y para cada parámetro estudiado se analizaron como mínimo 10.000 células. Para los diferentes análisis, se prepararon suspensiones celulares en tubos de citometría de poliestireno (12 x 75 mm) a partir de alícuotas de cada tratamiento diluídas en tampón fosfato salino (0,5 x PBS, *Phosphate Buffered Saline*) estéril (pH 7,2) para obtener una densidad final de 2×10^5 células mL⁻¹. Las concentraciones de fluorocromos que se utilizaron en este estudio permiten la tinción del 100% de las células microalgales analizadas en cada caso sin afectar a su viabilidad ni a su autofluorescencia basal. En todos los ensayos se analizan en el citómetro dos réplicas por matraz con células microalgales teñidas con el fluorocromo de interés y dos muestras con las células microalgales sin teñir.

Los parámetros se analizan en modo logarítmico, si no se menciona lo contrario, calculándose la media (u.a.) para la o las poblaciones celulares identificadas en el citograma mediante el *software* del equipo utilizado.

Los datos obtenidos son recogidos utilizando archivos *listmode*. El *software Kaluza Flow Cytometry Analysis V.1.1*. (Beckman Coulter Inc.) proporciona parámetros estadísticos y gráficas de las distribuciones de los valores obtenidos mediante esta técnica.

Preparación de fluorocromos y comprobación de la carga celular

Los fluorocromos utilizados se preparan en dimetilsulfoxido (DMSO) seco, en la mayoría de los casos a una concentración de 1 mg mL⁻¹. Se conservan a -20°C, protegidos de la luz y alicuotados (20-50 µl) en tubos *ependorff* para evitar su degradación por ciclos de congelación-descongelación. La excepción la constituye el yoduro de propidio (PI), que se prepara en tampón PBS pH 7,4, esterilizado en autoclave a 120°C durante 20 min, y que se conserva a 4°C.

La carga del fluorocromo en el interior de las células siempre se comprueba mediante la observación de las mismas en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400 equipado con una lámpara de mercurio.

3.5.1. Determinación de la densidad celular

La densidad celular de los cultivos se determina cada día hasta un total de 96 h de exposición a atrazina mediante recuento en el FCM del número de células microalgales presentes en cada uno de los cultivos utilizando una suspensión de concentración conocida de

fluoroesferas, *Flow-Count Fluorospheres* (Beckman Coulter Inc.). Estas fluoroesferas presentan un rango de emisión de fluorescencia entre 525 nm y 700 nm cuando se excitan a 488 nm.

Las tasas de crecimiento para cada tiempo y tratamiento ensayado (T.C.), expresadas en día⁻¹, se calculan mediante la siguiente fórmula:

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

dónde (t_0) y (t) son el tiempo inicial y final del período estudiado, ambos expresados en días, y (N_t) y (N_0) el número de células mL⁻¹ en esos tiempos.

El valor EC₅₀ para el crecimiento fue calculado usando el programa “CompuSyn” (Chou y Martin, 2005).

3.5.2. Análisis del tamaño y autofluorescencia celular

Se analizan mediante FCM el tamaño o volumen celular y la fluorescencia de la clorofila *a* de las microalgas expuestas a diferentes concentraciones del herbicida ensayado. Estos parámetros se estudian directamente a partir de las células en suspensión, sin utilizar ningún fluorocromo.

Tamaño celular

Las medidas se recogen en el detector que recoge la luz dispersada del láser entre 1 y 20° respecto al haz, así obtenemos la luz refractada en el ángulo anterior (*forward scatter light*, FS), que es proporcional al tamaño o volumen celular, aunque está influida por la estructura y composición intracelular (vesículas, ribosomas, etc.) (Mullaney et al., 1969).

Fluorescencia de la clorofila *a*

Los microorganismos fotosintéticos unicelulares, presentan generalmente una fluorescencia natural muy fuerte debido a la presencia de clorofila y sus derivados o de otros pigmentos accesorios como los carotenoides (diatomeas y dinoflagelados) y las ficobiliproteínas (criptófitas y cianobacterias) (Cunningham, 1993). La fluorescencia de la clorofila *a* se excita con luz a 488 nm y emite en el rango de 680-720 nm. La ventaja de estudiar la fluorescencia de pigmentos fotosintéticos en un citómetro de flujo es que las células están expuestas durante períodos muy cortos a la fuente de iluminación (del orden de 10 μs) y se minimiza el fenómeno de fotoblanqueamiento. Esto facilita el estudio de muchas poblaciones de proclorófitos oceánicos que son difícilmente detectables mediante microscopía de fluorescencia (Chisholm et al., 1988).

C. reinhardtii emite *in vivo* fluorescencia natural debido a la presencia de clorofila y de

otros pigmentos accesorios. La fluorescencia de la clorofila *a* se excita con luz a 488 nm y emite en el rango de 680-720 nm, por lo que la autofluorescencia microalgal es recogida en el detector FL4 (Prado et al., 2011). Debido a esto podemos estudiar simultáneamente con la autofluorescencia otros parámetros biológicos con fluorocromos que en su mayoría emiten por debajo de 600 nm de longitud de onda (Chisholm et al., 1988).

3.5.3. Análisis de viabilidad celular

Para detectar posibles diferencias en cuanto a viabilidad entre células de *C. reinhardtii* tratadas con atrazina y células control no tratadas con este herbicida, ensayamos dos fluorocromos ampliamente utilizados en estudios de toxicidad: el yoduro de propidio (PI) y el diacetato de fluoresceína (FDA).

Ioduro de propidio (PI)

El fluorocromo PI (*propidium iodide*) se intercala entre los pares de bases de ácidos nucleicos de doble cadena (Carter, 1990), produciendo fluorescencia roja (emisión máxima a 617 nm) cuando es excitado con luz azul (488 nm). Cuando la membrana plasmática de las células está intacta, el fluorocromo no es capaz de penetrar al interior celular; sin embargo, en aquellas células dañadas, que tienen alterada la integridad de su membrana plasmática, el fluorocromo penetra y se une a los ácidos nucleicos. Por ello, el PI permite discriminar entre células viables no fluorescentes (PI-) y células no viables fluorescentes (PI+) mediante su análisis en el citómetro de flujo.

La fluorescencia del PI se recoge en el citómetro de flujo en el detector FL3 (605-635 nm) y en escala logarítmica. Las suspensiones microalgales se incuban con una concentración final de PI de 4 μM (a partir de una solución *stock* de 1 mg mL^{-1} en PBS, guardada a 4°C), durante 10 min, en oscuridad y a temperatura ambiente para su posterior análisis en el citómetro (Prado et al., 2009a). Esta concentración permite el marcaje del 100% de las células no viables, sin afectar a la fluorescencia ni presentar toxicidad para las células viables.

Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de células viables (PI-) con respecto al total de células analizadas.

Validación del método

Para validar el método se tiñen con PI, en las condiciones descritas anteriormente, distintas suspensiones celulares con porcentajes conocidos de células intactas y células muertas sometidas a choque térmico de microondas durante 10s a 700 W. Se analizan en el citómetro y se observa si los porcentajes obtenidos de células viables y no viables se

corresponden con los porcentajes nominales de la mezcla correspondiente. Se obtienen citogramas en los que los porcentajes de células en cada región indican el porcentaje de cada tipo de célula determinado por el citómetro y correspondiente a mezclas de 100/0%, 0/100% y 50/50% de células vivas (PI-)/muertas(PI+) (Fig. 11).

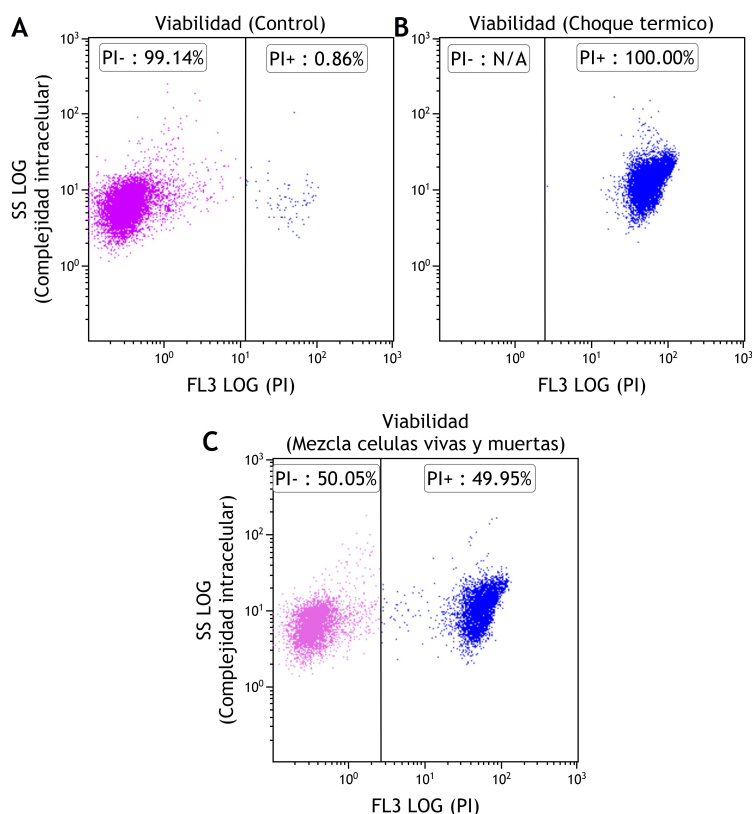


Figura 11. Validación del método de análisis de vitalidad celular mediante FCM utilizando PI. Los citogramas muestran los porcentajes de células viables (PI-) y no viables (PI+) correspondientes a mezclas de células vivas/muertas: 100/0% (A); 0/100% (B) y 50/50% (C).

3.5.4. Análisis *in fluxo* de la actividad esterasa inespecífica a tiempo real

Para el estudio de la actividad esterasa inespecífica como medida de la actividad metabólica *in vivo* de las células de *C. reinhardtii*, se han llevado a cabo ensayos cinéticos, *in fluxo*, basados en la generación de fluorescencia derivada de la hidrólisis enzimática del FDA (Klut et al., 1989). El FDA (*fluorescein diacetate*; diacetato de fluoresceína) es una sustancia lipofílica y no fluorescente que penetra libremente en las células vivas. Una vez dentro, la molécula de FDA pierde los grupos acetato debido a la acción de esterasas citoplasmáticas no

específicas que hidrolizan los enlaces éster en las células activas. La fluoresceína resultante es una molécula hidrofílica altamente fluorescente, que queda retenida en el interior celular de aquellas células que tengan intacta la integridad de su membrana plasmática. En este caso, la ausencia de fluorescencia verde de la fluoresceína indica efectos tóxicos sobre la membrana celular y/o la actividad de las esterases, que son enzimas esenciales para el funcionamiento normal de la célula. De este modo, podremos distinguir entre células fluorescentes metabólicamente activas (FDA+) y células no fluorescentes no metabólicamente activas (FDA-). Las células fluorescentes metabólicamente activas son siempre viables. Sin embargo, las células no fluorescentes metabólicamente inactivas pueden ser viables (sin actividad esterasa) o no viables (con alteraciones en la membrana plasmática que impiden la retención de la fluoresceína en el interior celular) (Jochem, 2000). Mediante citogramas biparamétricos, se analiza el incremento de la fluorescencia verde de la fluoresceína (FL1 log; eje y), a lo largo del tiempo de incubación (eje x). Se preparan suspensiones celulares (2 mL) y se analizan en el citómetro sin tinción durante 20 s para ajustar la línea base de autofluorescencia verde de las células. Se detiene la adquisición y, rápidamente, se añade el volumen necesario de FDA para obtener una concentración final de 0,24 μM (a partir de una solución *stock* de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en DMSO, guardada a -20°C) (Prado et al., 2012a). Se reanuda la adquisición y se estudian los cambios en el detector FL1 log frente al tiempo hasta que la fluorescencia se estabiliza (tiempo total de 5 min).

Para calcular la actividad esterasa inespecífica de las células microalgales, se obtienen las medias de fluorescencia de la fluoresceína para diferentes tiempos de incubación, definiendo en cada citograma regiones rectangulares sobre el eje tiempo, de base un número canal y de altura todo el eje y. La fluorescencia del FDA puede verse afectada por cambios en el volumen celular (Agustí et al., 1998), de modo que, para evitar esta variabilidad debida a posibles diferencias en el tamaño celular y la concentración intracelular del fluorocromo, se utiliza la relación entre la fluorescencia recogida en FL1 y el tamaño celular (FS). Las tasas máximas de generación de fluorescencia verde intracelular de *C. reinhardtii* tras la adición de FDA se calculan representando para cada citograma los valores medios de fluorescencia FL1 obtenidos frente al tiempo, desde que se añade el fluorocromo hasta que la señal de fluorescencia empieza a estabilizarse; luego se ajusta la curva obtenida a una función polinomial lineal con un coeficiente de R^2 superior a 0,95; así obtenemos la ecuación de la recta y podemos calcular la pendiente, que es asimilable a la tasa de generación de fluorescencia verde y, por lo tanto, a la actividad esterasa inespecífica de las células microalgales. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia por unidad de tiempo

(u.a. Min^{-1}).

Validación del método

Como control negativo se analizan células sometidas a choque térmico con microondas, 10 s a 700 W, que por lo tanto no son viables y son incapaces de romper enzimáticamente el FDA (Fig. 12).

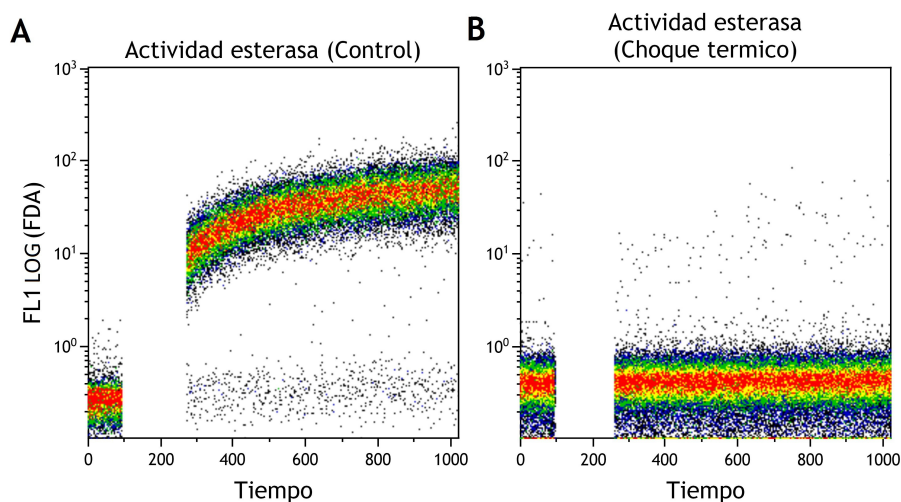


Figura 12. Incremento de la emisión de fluorescencia de la fluoresceína (recogida en el detector FL1) a lo largo del tiempo, como resultado de la rotura enzimática del diacetato de fluoresceína por esterases intracelulares, en un cultivo control, que no ha sido sometido a ningún tipo de estrés (**A**) y en un cultivo con células no viables, que han sido sometidas a choque térmico con microondas (**B**).

3.5.5. Análisis del estrés oxidativo

Todos los organismos aerobios producen durante sus procesos metabólicos las denominadas especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*; ROS) (Perl-Treves y Perl, 2002).

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de oxígeno reactivo y la capacidad de un sistema biológico de destoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Este entorno reductor es preservado por los enzimas que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Desajustes en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la

producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el DNA (Foyer y Noctor, 2005).

Las ROS tienen una vida media muy corta y están presentes a unas concentraciones celulares muy bajas, por ello la FCM es una técnica ideal para su estudio ya que es rápida y muy sensible (Tarpey y Fridovich, 2001).

Las ROS estudiadas son el ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) utilizando el fluorocromo hidroetidina (HE, *Hydroethidine*) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) utilizando el indicador dihidrorrodamina 123 (DHR 123, *Dihydrorhodamine*).

Nivel intracelular de ión superóxido (HE)

El HE difunde a través de las membranas celulares y sufre oxidación por iones superóxido formando etidio, que se intercala en el DNA y queda retenido en el interior celular (Benov et al., 1998).

La fluorescencia del HE se analiza en el FCM en el detector FL3 (605-635 nm), ya que cuando el etidio se excita a 488 nm, tiene una emisión de fluorescencia máxima en torno a los 605 nm. Las suspensiones celulares se incuban durante 30 min, en oscuridad y a temperatura ambiente en presencia de una concentración final de HE de 16 μM (a partir de una solución *stock* de 1 mg mL⁻¹ en DMSO, almacenada a -20°C) (Prado et al., 2012a).

Los resultados obtenidos se expresan como la media de la fluorescencia (u.a.) recogida en FL3 normalizada por el tamaño (FS).

Validación del método

Para validar el método se indujo un estrés oxidativo exógeno mediante la incubación de las células, previamente teñidas con HE en las condiciones descritas, con un prooxidante conocido, el H_2O_2 , a una concentración de 5 mM y 10 mM durante 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad. A medida que aumenta la concentración de H_2O_2 se observa un aumento de la fluorescencia de FL3, es decir un aumento del nivel intracelular de ión superóxido (Fig. 13).

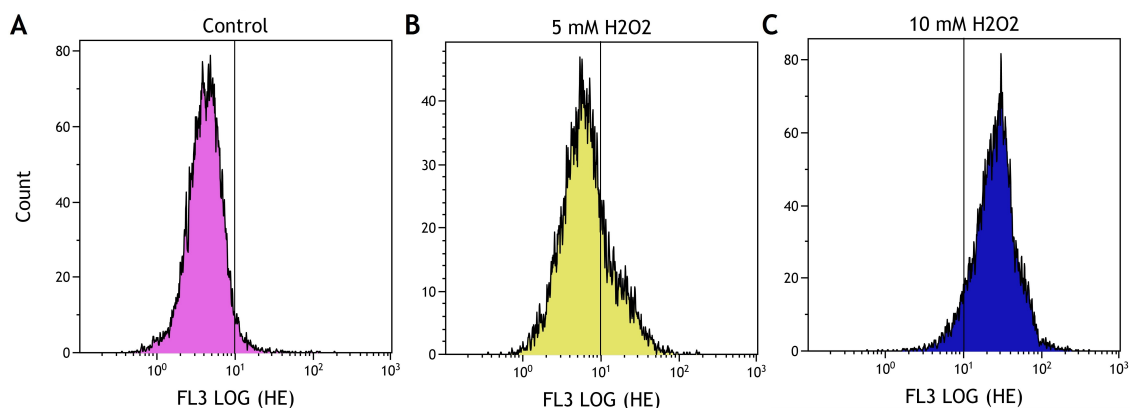


Figura 13. Validación del método de determinación de ión superóxido intracelular mediante FCM. Se representan los citogramas correspondientes a un cultivo control (**A**), un cultivo sometido a H₂O₂ 5 mM (**B**) y un cultivo sometido a H₂O₂ 10 mM (**C**).

Nivel intracelular de peróxido de hidrógeno (DHR123)

El DHR 123 atraviesa libremente la membrana citoplasmática y es oxidado en el interior celular, principalmente por H₂O₂. La oxidación es lenta menos cuando está mediada por peroxidasas celulares y secundariamente por iones peroxinitrito. El producto de esta oxidación es la rodamina 123, una molécula fluorescente (emisión máxima a 529 nm), catiónica y lipofílica, que es atrapada específicamente en la mitocondria y queda retenida en el interior celular (Royall y Ischiropoulos, 1993). Hay estudios que demuestran la especificidad de la DHR123 por el peróxido de hidrógeno y que concluyen que la oxidación de este fluorocromo indica sólo la presencia de peróxido de hidrógeno y peroxidasas intracelulares, pero no la generación de iones superóxido (Henderson y Chappell, 1993).

La fluorescencia del DHR 123 se analiza en el citómetro de flujo en el detector FL1 (505-545 nm). Para la tinción de las suspensiones celulares, se utiliza una concentración final de DHR 123 de 29 µM (a partir de una solución stock de 2 mg mL⁻¹ en DMSO, guardada a -20°C), con un tiempo de incubación de 40 min en oscuridad y temperatura ambiente, para su posterior análisis en el citómetro de flujo (Prado et al., 2012a).

Los resultados obtenidos se expresan como la media de la fluorescencia (u.a.) recogida en FL1 normalizada por el tamaño (FS).

Validación del método

Para validar el método se indujo un estrés oxidativo exógeno mediante la incubación de las células, previamente teñidas con DHR123 en las condiciones descritas, con un prooxidante conocido, el H₂O₂, a una concentración 5 mM y 10 mM durante 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad. A medida que aumenta la concentración de H₂O₂ se observa un aumento de la fluorescencia de FL1, es decir un aumento del nivel intracelular de peróxido de hidrógeno (Fig. 14).

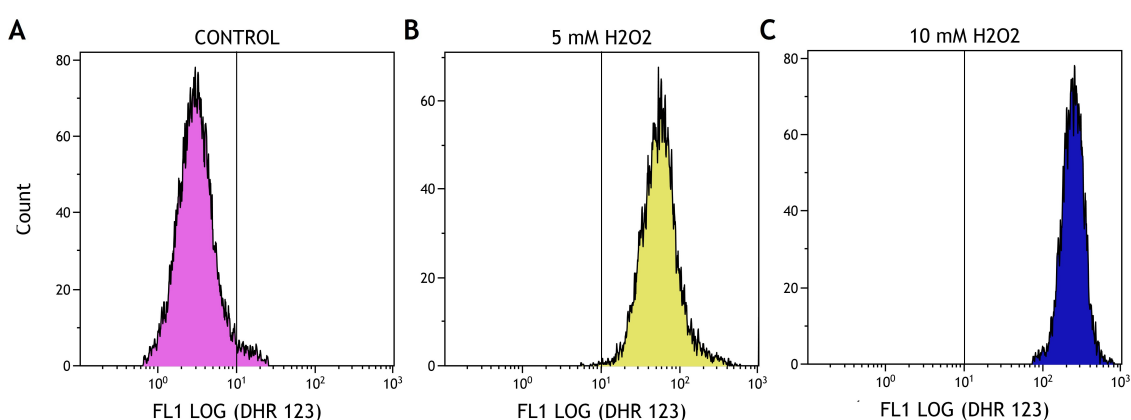


Figura 14. Validación del método de determinación del peróxido de hidrógeno intracelular mediante FCM. Se representan los citogramas correspondientes a un cultivo control (**A**), un cultivo sometido a H₂O₂ 5 mM (**B**) y un cultivo sometido a H₂O₂ 10 mM (**C**).

3.5.6. Análisis de la concentración de Ca²⁺ libre intracelular

El ión calcio (Ca²⁺) cumple un papel muy importante como mediador en la transducción de las señales transmembrana, y aumentos en la concentración del ión calcio intracelular son parte de la regulación de diversos procesos celulares.

El fluorocromo seleccionado para este estudio ha sido el *Calcium Green-1* acetoximetil éster (*Calcium Green-1 AM*). Se trata de un indicador muy sensible a los cambios en la concentración de Ca²⁺. El *Calcium Green-1 AM* atraviesa la membrana citoplasmática y, una vez dentro de la célula, esterasas inespecíficas rompen la molécula dando lugar a *Calcium Green*, una molécula fluorescente que, al ser excitada a 488 nm, emite fluorescencia con un máximo a 530 nm, fluorescencia que se multiplica tras su unión a iones Ca²⁺.

La fluorescencia del *Calcium Green* se recoge en el detector FL1 (505-545 nm). Para el

proceso de tinción, se preparan suspensiones celulares de *C. reinhardtii*, utilizándose una concentración final de fluorocromo de 8 μM (a partir de una solución concentrada de 2 mg mL^{-1} en DMSO, almacenada a -20°C) con un tiempo de incubación de 2 h a 30°C y en oscuridad, para su posterior análisis en el citómetro de flujo (Prado et al., 2012b).

Los resultados obtenidos se expresan como la media de la fluorescencia (u.a.) en FL1 de la población analizada.

Validación del método

Kuin et al. (2000) obtuvieron resultados que indican que la mayor parte del calcio presente en las células de *Chlamydomonas* no se encuentra libre en el citosol sino concentrado en cuerpos electrondensos, y el mastoparan, un conocido activador de proteínas G, induce la liberación de Ca^{2+} de estos cuerpos electrondensos hacia el citoplasma de la célula. En base a esto, para validar el método establecido de determinación de la concentración de Ca^{2+} intracelular mediante citometría de flujo, se llevó a cabo la tinción de las células con el fluorocromo en ausencia y presencia de mastoparan, añadido a una concentración de 14 μM a partir de una solución stock 1 mg mL^{-1} en agua destilada (Fig. 15).

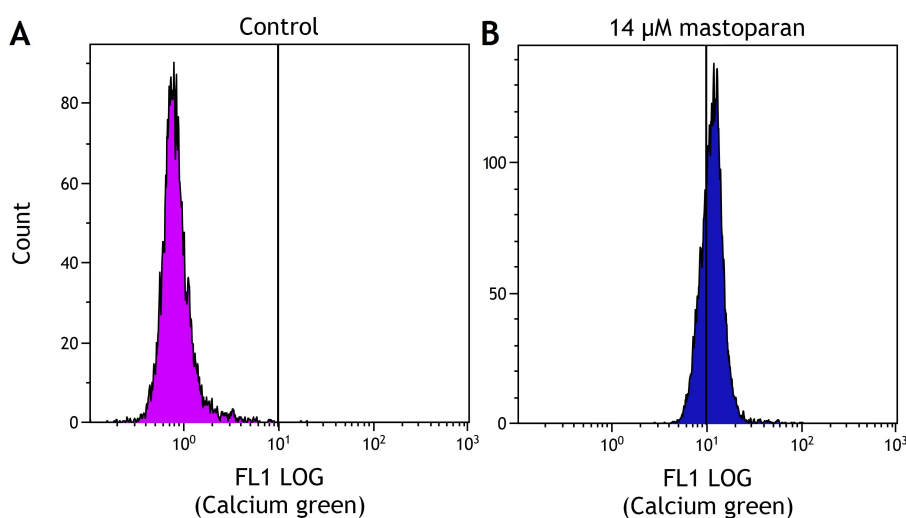


Figura 15. Validación del método de análisis de la Ca^{2+} intracelular mediante FCM. Se representan los citogramas correspondientes a suspensiones de células teñidas con *Calcium Green-1 AM* en ausencia de mastoparan (**A**) y en presencia de 14 μM de mastoparan (**B**).

3.5.7. Análisis del potencial de membrana citoplasmática

Se considera que el mantenimiento de un potencial transmembrana negativo es un mecanismo de control que permite que las células permanezcan en un estado inactivo, de modo que se ha sugerido que cualquier cambio en este potencial de membrana citoplasmático, por ejemplo como consecuencia de la unión de ciertos ligandos a receptores transmembrana, puede ser mediador de la consiguiente respuesta fisiológica celular.

El fluorocromo utilizado en este trabajo, bis-(1,3-ácido dibutilbarbitúrico) trimetino oxonol (*bis-(1,3-dibutylbarbituric acid trimethine oxanol*; DiBAC₄(3)), pertenece a la familia de los fluorocromos derivados del oxonol. Se trata de un indicador de respuesta lenta aniónico, cuya concentración celular aumenta a medida que el potencial de membrana baja hacia cero y disminuye si la célula se hiperpolariza, i.e., el citosol se vuelve más electronegativo con respecto al medio.

El DiBAC₄(3) es una molécula aniónica que penetra en la célula con mayor facilidad a través de membranas celulares relativamente despolarizadas donde es retenida por unión a lípidos y proteínas intracelulares. La carga negativa del fluorocromo provoca su exclusión de la mitocondria, cuyo potencial de membrana es altamente negativo, lo que reduce este componente de la fluorescencia total y simplifica la medida del potencial de membrana en eucariotas (Klapperstück et al., 2009).

La fluorescencia del DiBAC₄(3) se analiza en el detector FL1 (505-545 nm). Suspensiones de *C. reinhardtii* se incuban con una concentración final fluorocromo de 1 μM (a partir de una solución concentrada de 1 mg mL^{-1} en DMSO, guardada a -20°C) durante 10 min, en oscuridad y a temperatura ambiente (Prado et al., 2012a). Posteriormente, se procede al análisis de las muestras en el citómetro de flujo.

Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de células despolarizadas (DiBAC₄(3)+) con respecto al total de células analizadas.

Validación del método

Para validar el método, se induce una despolarización de la membrana de las células resuspendiéndolas en tampón a una concentración de 10 mM cloruro potásico y permeabilizando sus membranas con digitonina. El tampón de cloruro potásico se prepara en tampón 0,5 x PBS pH 7,2.

Las células se resuspenden en el tampón preparado y se tiñen con DiBAC₄(3) bajo las condiciones establecidas. A continuación, dichas células se incuban con digitonina a una

concentración final de 33 μM , a partir de una solución *stock* de digitonina de 4 mg mL^{-1} en DMSO, durante 30 min en oscuridad y a temperatura ambiente (Fig. 16). La digitonina permeabiliza selectivamente las membranas plasmática y nuclear frente a orgánulos como la mitocondria debido a diferencias en la composición en colesterol de las membranas de estos orgánulos (Rabinovitch y June, 1990). La despolarización provocada por la permeabilización de la membrana con digitonina y la concentración creciente de iones potasio provocó efectivamente un aumento en la fluorescencia del indicador. Los ionóforos valinomicina o gramicidina, habitualmente utilizados en la bibliografía para estos controles, no son adecuados en este estudio, debido a que forman complejos con las moléculas de oxonol (Deere et al., 1995, Rabinovitch y June, 1990).

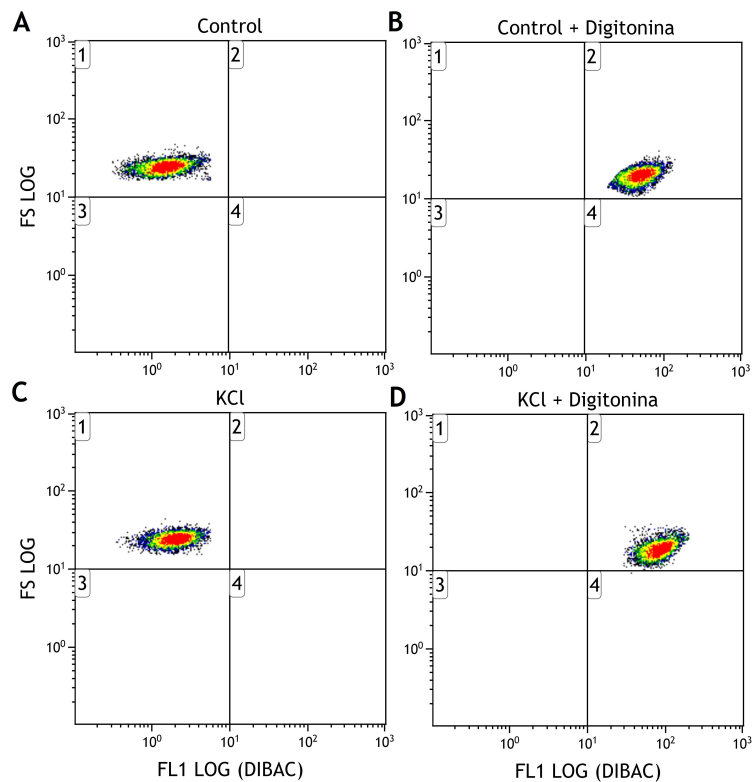


Figura 16. Validación del método de determinación del potencial de membrana citoplasmático mediante FCM. Se representan los citogramas correspondientes a un cultivo control sin digitonina (A), un cultivo control con digitonina (B), $[\text{KCl}] = 10 \text{ mM}$ (C), un cultivo en tampón con $[\text{KCl}] = 10 \text{ mM}$ e incubado con digitonina (D).

3.5.8. Análisis del potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial se analiza mediante citometría de flujo utilizando el catión lipofílico yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide; JC-1), un fluorocromo que es internalizado y concentrado por la mitocondria, formando agregados a medida que la membrana interna de este orgánulo se hiperpolariza (Qu et al., 2001), y cambia reversiblemente su espectro de emisión fluorescente desde 525 nm (verde) a 590 nm (amarillo-naranja) a medida que el potencial de membrana mitocondrial aumenta (Cossarizza y Salvioli, 2001). Tanto en el citoplasma como en la mitocondria, cuando el potencial de membrana es bajo, este fluorocromo se presenta en su forma monomérica, que al ser excitada con luz azul (488 nm), emite fluorescencia con un máximo a 525 nm. En el interior de la matriz mitocondrial, cuando el potencial de membrana es muy negativo, el JC-1 forma agregados que emiten fluorescencia a 590 nm (Shapiro, 1995).

La fluorescencia del JC-1 se analiza en el detector FL1 (505-545 nm) y FL3 (605-635 nm). Las suspensiones de *C. reinhardtii* se incuban con una concentración final fluorocromo de 3 μM (a partir de una solución concentrada de 1 mg mL^{-1} en DMSO, guardada a -20°C) durante 20 min, en oscuridad y a temperatura ambiente (Prado et al., 2012b). Posteriormente, se procede al análisis de las muestras en el citómetro de flujo.

Los resultados se expresan como la relación entre la fluorescencia de la forma agregada y la fluorescencia de la forma monomérica (relación FL3/FL1), de modo que el potencial así estimado es independiente del tamaño de la célula y la concentración intracelular de JC-1.

Validación del método

Como control positivo para validar el método, alícuotas de 2×10^5 células mL^{-1} se incubaron con 49 μM de carbonilcianida m-clorofenilhidrazona (*carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone*; CCCP), un ionóforo que desacopla la fosforilación oxidativa, a partir de una solución stock 1 mg mL^{-1} en DMSO durante 15 min a temperatura ambiente, y luego se tiñeron con el fluorocromo JC-1 en las condiciones establecidas (Smiley et al., 1991) (Fig. 17). Este ionóforo de H^+ elimina el gradiente electroquímico mitocondrial, reduciendo la entrada de JC-1, y por tanto la aparición de la forma agregada del fluorocromo, en las mitocondrias de *Chlamydomonas*.

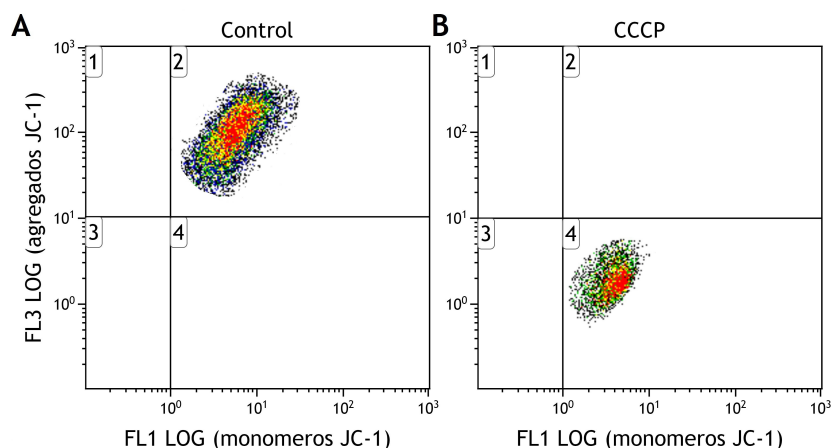


Figura 17. Validación del ensayo de determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante FCM. En los citogramas biparamétricos se representa la fluorescencia emitida por la forma monomérica (FL1) del fluorocromo JC-1 frente a la fluorescencia emitida por la forma agregada (FL3) del mismo, para células control **(A)** y células incubadas con CCCP **(B)**.

3.5.9. Análisis de la actividad caspasa

Para detectar la potencial presencia de actividad caspasa en las células de *C. reinhardtii* sometidas a los diferentes tratamientos, se ha utilizado el *CellEvent Caspase -3/7 Green kit (Molecular Probes)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo consta de un péptido de cuatro aminoácidos (DEVD), denominado *Caspase-3/7 Green*, conjugado con una molécula fluorescente con capacidad de unión a ácidos nucleicos. La presencia del péptido bloquea la unión del marcador fluorescente al DNA celular, pero la activación de las caspasas 3 y 7 provoca la escisión del péptido y la consiguiente liberación de la molécula fluorescente. Esto permite al fluorocromo unirse al DNA y producir una señal fluorescente dependiente de la actividad de estas enzimas que puede ser analizada en el FCM con un máximo de absorción/emisión de 502/530nm.

La fluorescencia de dicho marcador fluorescente se recoge en el citómetro de flujo en el detector FL1 (505-545 nm). Para proceder al marcaje de las suspensiones celulares, éstas se incuban con el reactivo *Caspase -3/7 Green* siguiendo el protocolo del fabricante. Después de 1 h en oscuridad y a temperatura ambiente, las muestras se analizan en el FCM.

Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de células con actividad caspasa (caspasa+) con respecto al total de células analizadas.

Validación del método

Como control positivo para validar el método, alícuotas de 2×10^5 células mL^{-1} se incubaron con $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cobre, concentración correspondiente a una afectación del 50% sobre el crecimiento de las células microalgales en base a trabajos previamente descritos (Saad et al., 2016), durante 24 h y luego se tiñeron con el reactivo *Caspase -3/7 Green* siguiendo el protocolo del fabricante, en las microalgas expuestas a cobre aumenta el número de células con actividad caspasa+ (Fig. 18).

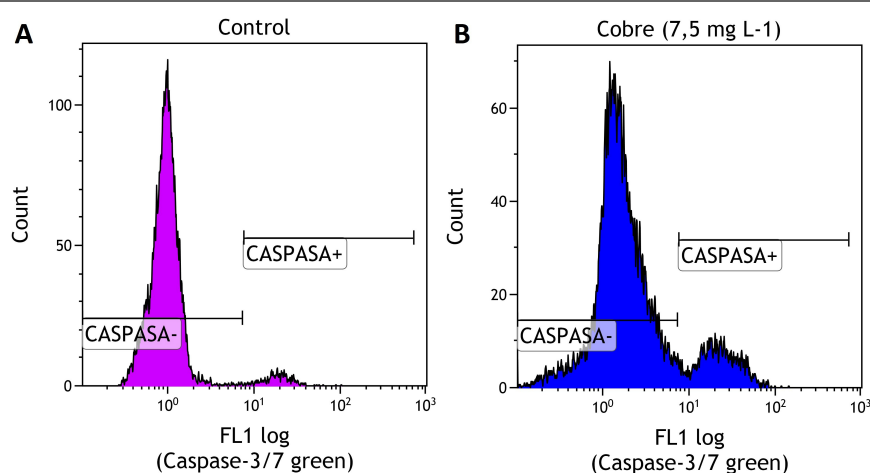


Figura 18. Validación del método de la actividad caspasa mediante FCM. Se representan los citogramas correspondientes a suspensiones de células teñidas con *Caspase-3/7 Green* en ausencia de cobre (**A**) y en presencia de $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cobre (**B**).

3.6. Análisis mediante microscopía de fluorescencia

Se utiliza la microscopía de fluorescencia para estudiar fenómenos relacionados con la muerte celular programada o senescencia en las células microalgales. El fluorocromo DAPI se utilizó para estudiar los cambios en la morfología nuclear y distribución de la cromatina (Darehshouri et al., 2008) y la monodansilcadaverina (MDC) fue utilizada para estudiar la presencia de vacuolas autofágicas (Contento et al., 2005, Lee et al., 2013). Las muestras preparadas fueron examinadas posteriormente a X 400 aumentos utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400 (instrumentos Nikon Europe BV) equipado con filtros de UV-2A (excitación 330-380 nm, espejo dicróico 400 nm, filtro barrera 420 nm) para detectar las emisiones de fluorescencia de los fluorocromos DAPI y MDC. Un centenar de células fueron aleatoriamente analizadas por cultivo (50 células por portaobjeto), contando el número de

células afectadas. En ambos estudios, los resultados se expresaron como el porcentaje de células afectadas con respecto a la cantidad total de células analizadas. Las fotografías fueron tomadas con una cámara refrigerada de alta resolución Nikon DS-5MC y las imágenes fueron tratadas con el software de imágenes Nis-Elements (versión 2.2; Nikon Instruments Europe BV).

3.6.1. Estudio de alteraciones en el núcleo

Con el fin de detectar cambios en la morfología del núcleo de las células de *C. reinhardtii* se llevó a cabo la tinción de las células con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; 4',6- *Diamidino-2-Phenylindole*).

El DAPI se une a regiones ricas en AT de la doble hélice de DNA. Se retiran 5×10^6 células por centrifugación y se resuspenden en 1 mL de tampón PBS pH 7,2 estéril. A continuación, se incuban a una concentración final de DAPI de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (a partir de una solución concentrada de 5 mg mL^{-1} en DMSO, almacenada a -20°C) durante 10 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, estas suspensiones celulares se embeben en agarosa con bajo punto de fusión (LMA) al 0,7% (p/v) para su posterior observación al microscopio (Esperanza et al., 2015).

Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de células con núcleos que presentan alteraciones en la cromatina (DAPI+) con respecto al total de células analizadas.

Validación del método

Como control positivo para validar el método, alícuotas de 2×10^5 células mL^{-1} se incubaron con $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cobre, concentración correspondiente a una afectación del 50% sobre el crecimiento de las células microalgales en base a trabajos previamente descritos (Saad et al., 2016), durante 24 h. A continuación, las células se tiñen con DAPI siguiendo las instrucciones anteriormente comentadas. En las microalgas expuestas a cobre aumenta el número de células con núcleos que presentan alteraciones en la cromatina (DAPI+) (Fig. 19).

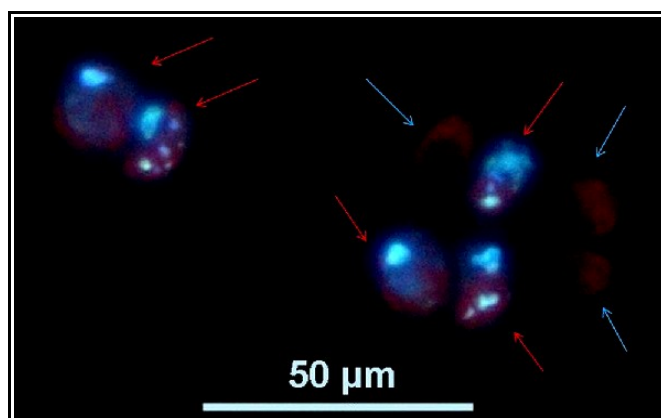


Figura 19. Células de *C. reinhardtii*, expuestas a $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cobre durante 24 h, vistas por microscopía de epifluorescencia y teñidas con DAPI. Las flechas rojas indican células con alteraciones en la cromatina del núcleo (DAPI+) y las flechas azules indican células sin alteraciones en el núcleo (DAPI-).

3.6.2. Estudio de la presencia de vacuolas autofágicas

Con el fin de detectar cambios en el interior de las células de *C. reinhardtii* se llevó a cabo la tinción de las células con monodansilcadaverina (MDC, *Monodansylcadaverine*).

La MDC es un fluorocromo que nos permite detectar *in vivo* la presencia de vacuolas autofágicas. Se retiran 5×10^6 células por centrifugación y se resuspenden en 1 mL de tampón PBS pH 7,2 estéril. A continuación, se incuban a una concentración final de MDC de $16,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (a partir de una solución concentrada de 2 mg mL^{-1} en DMSO, almacenada a -20°C) durante 10 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, estas suspensiones celulares se embeben en agarosa con bajo punto de fusión (LMA) al 0,7% (p/v) para su observación al microscopio.

Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de células con vesículas autofágicas (MDC+) con respecto al total de células analizadas.

Validación del método

Como control positivo para validar el método, alícuotas de 2×10^5 células mL^{-1} se incubaron con $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cobre, concentración correspondiente a una afectación del 50% sobre el crecimiento de las células microalgales en base a trabajos previamente descritos (Saad et al., 2016), durante 24 h. A continuación, las células se tiñen con MDC siguiendo las instrucciones anteriormente comentadas. En las microalgas expuestas a cobre aumenta el

número de células con vesículas autofágicas (MDC+) (Fig. 20).

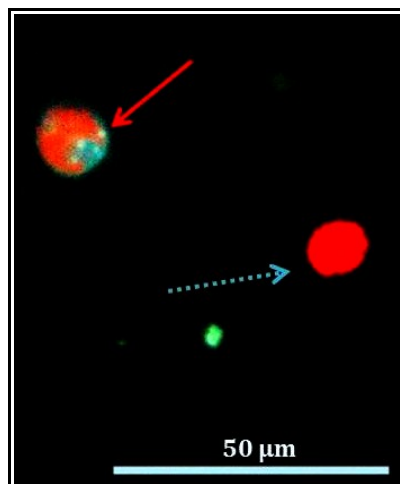


Figura 20. Células de *C. reinhardtii*, expuestas a $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cobre durante 24 h, vistas por microscopía de epifluorescencia y teñidas con MDC. La flecha roja indica una célula con autofagosomas (MDC+) y la flecha azul indica una célula sin autofagosomas (MDC-).

3.7. Análisis mediante espectrofotometría

Se midieron los niveles de peroxidación lipídica, la actividad catalasa y el contenido en proteínas de las células de *Chlamydomonas reinhardtii*.

5×10^6 células fueron recogidas por centrifugación y resuspendidas en $800 \mu\text{L}$ de tampón fosfato (50 mM) que contiene ácido tricloroacético (TCA) ($0,67\%$, p/v) en el caso del protocolo para el estudio de peroxidación de lípidos. A continuación se procede a la rotura celular mediante ultra sonicación 400 mA durante 180 s . Los homogeneizados fueron centrifugados y el sobrenadante se recogió y fue almacenado a -80°C . El contenido de proteínas total de cada sobrenadante fue medido por el ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad, Canadá) utilizando el colorante de G-250 azul brillante de Coomassie (lectura de absorbancia a 600 nm) (Bradford, 1976).

3.7.1. Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica (LP) se midió como un indicador de daño mediado por ROS. Se midieron los niveles de productos de peroxidación de lípidos como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) según los métodos descritos por Heath y Packer (1968) con algunas modificaciones. El método se basa en la producción de malondialdehído (MDA) durante la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados. $150 \mu\text{L}$ del sobrenadante se mezclaron con $450 \mu\text{L}$

de 0,5% de ácido tiobarbitúrico (TBA) (p/v) en un 20% TCA (p/v). La mezcla se calentó a 95°C durante 30 min, a continuación se enfrió en hielo durante 10 min y se centrifugó a 15.000 rpm durante 2 min. La absorbancia del sobrenadante se midió con un espectrofotómetro (*Eon Microplate Spectrophotometer by BioTek Instruments*) a 532 nm y fue corregida la turbidez restando la absorbancia de la muestra a 600 nm. La absorbancia de la solución de 0,5% TBA y 20% TCA fue utilizada como blanco. Se realizó una curva estándar ($R^2 = 0.99$) utilizando diferentes concentraciones de 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Los resultados se expresaron como $\mu\text{M MDA} / 5 \times 10^6$ células.

3.7.2. Actividad catalasa

El protocolo para medir la actividad catalasa (CAT) en *C. reinhardtii* fue adaptado de Aebi (1984). 15 μL del sobrenadante se mezcló con 95 μL de KH_2PO_4 a 50 mM y pH 7.0 y 50 μL de H_2O_2 a 19 mM. La absorbancia se leyó cada 40 s hasta un total de 120 s a 240 nm (*Eon Microplate Spectrophotometer by BioTek Instruments*). La actividad de la catalasa fue expresada en Unidades / μg proteína utilizando un coeficiente de extinción molar para el H_2O_2 de $0,0436 \text{ m}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.8. Análisis de alteraciones a nivel del transcriptoma

Para llevar a cabo el estudio de las potenciales alteraciones del transcriptoma en el organismo modelo *C. reinhardtii*, los cultivos microalgales se expusieron durante 3, 24 y 96 h a la concentración de 0,25 μM que es aproximadamente la EC_{50} para el crecimiento tras 96 h de exposición a atrazina, además a esta concentración la viabilidad celular no se vio afectada.

3.8.1. RNA-Seq

En el protocolo utilizado para la extracción de RNA se parte siempre de un *pellet* con una densidad celular conocida, 10×10^7 células. La extracción de RNA se realiza usando el reactivo NZYol (NZYTech) y utilizando material tratado libre de nucleasas. Las muestras previamente congeladas son homogenizadas en un mortero utilizando nitrógeno líquido, añadiéndose 1 mL de NZYol. Posteriormente, se transfiere todo a un tubo libre de 1,5 mL. Después se añaden 0,2 volúmenes de cloroformo-isoamil alcohol (24:1, v:v), se centrifuga y se recoge el sobrenadante en un tubo nuevo. A continuación se le añade un volumen de isopropanol frío (almacenado a -25°C) y la mezcla final se incuba durante toda la noche a -20°C para que el RNA precipite. Se centrifugan las muestras y se descarta el sobrenadante. El *pellet*, que contiene el RNA, se lava con 75% de etanol, se vuelve a centrifugar, se descarta el sobrenadante y el *pellet* se resuspende en un volumen final de 30 μL (Chomczynski y Sacchi, 2006).

Después se lleva a cabo un tratamiento con DNasa. Para ello se añaden 2,5 µL de *RQ1 RNase-Free DNase 10 X Reaction Buffer* (Promega), 2 unidades de *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega) y 21,5 µL de la solución de RNA.

La integridad y concentración del RNA se mide en un bioanalizador Agilent 2100.

Tabla 1. Muestras analizadas mediante RNA-Seq

Tiempo de exposición (h)	Concentración de atrazina (µM)	HiSeq 2000 lane nº
3	0 (Control)	1
3	0 (Control)	1
3	0,25	1
3	0,25	1
24	0 (Control)	1
24	0 (Control)	1
24	0,25	1
24	0,25	1
24	0,25	1
96	0 (Control)	1
96	0 (Control)	1
96	0,25	1
96	0,25	1

A continuación se construyeron 13 librerías DNAC (una por muestra) (Tabla 1), usando el *TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2* (Illumina), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación las muestras fueron depositadas en cantidades equimolares de acuerdo con las concentraciones de DNA medidas utilizando el *Qubit dsDNA HS Assay Kit* (Life Technologies). A continuación el *pool* es secuenciado en una línea del HiSeq 2000 PE100.

La construcción de la librería de DNAC y la secuenciación fueron llevadas a cabo con la colaboración de AllGenetics & Biology, SL. El análisis bioinformático posterior fue llevado a cabo con la colaboración de ECSEQ bioinformatics.

3.8.2. RT-qPCR de enzimas antioxidantes

El RNA total se aisló utilizando el *kit RNeasy® Plus Mini* (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada réplica (n=3) se partió de 5×10^6 células de *C. reinhardtii* para realizar las extracciones. La retrotranscripción se llevó a cabo a partir de 500 ng de RNA y se utilizó el *kit RNA QuantiTect Reverse Transcription* (Qiagen) siguiendo las

instrucciones del fabricante. El DNAc obtenido fue usado como molde para realizar la RT-qPCR y así analizar el nivel de transcritos de los diferentes genes relacionados con el estrés oxidativo: ascorbato peroxidasa (*APX I*), catalasa (*CAT*), Mn-superóxido dismutasa (*SOD-1*), glutatión peroxidasa (*GPX*) y glutatión S-transferasa (*GST*). En la tabla 2 se pueden encontrar los genes seleccionados para este estudio, los nombres, abreviaturas, la secuencia de los *primers*, la eficiencia específica de los *primers* (%) y la longitud de los amplicones (bp).

La PCR en tiempo real se llevó a cabo usando el *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad) siguiendo las indicaciones del protocolo de Sanchez et al. (2015) y usando placas de 96 pocillos. Cada reacción se realizó por duplicado, utilizando 5 µL cDNA (equivalentes a 5 ng DNAc), 6,5 µL de *iQ™ SYBR® Green Supermix*, *primers* (300 nM de cada uno) y agua tratada con pirocarbonato de dietilo (*Diethyl pyrocarbonate*, DEPC) hasta completar un volumen final de 13 µL. Los parámetros elegidos fueron: 95 °C durante 2 min, 40 ciclos a 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 5 s. La amplificación específica fue verificada con una curva de *melting*. Un control sin molde (NTC) fue incluido en cada placa. Los datos fueron adquiridos y analizados usando el *software CFX Manager™* (Bio-Rad). Los valores de los ciclos umbrales (*Ct*) fueron utilizados para seleccionar los mejores genes de referencia, en nuestro caso *BTUB* (*Beta tubuline 2*), *UBCX* (*Ubiquitin-conjugating enzyme E2*) y *CBLP* (*G protein beta subunit-like polypeptide*).

La transcripción relativa de los genes fue calculada usando los genes de referencia (*CBLP*, *BTUB* y *UBCX*) y los valores *Ct* fueron corregidos mediante la eficiencia estimada de la PCR. El método del *Ct* comparativo ($\Delta\Delta Ct$) (Livak y Schmittgen, 2001) fue empleado para calcular la cuantificación relativa. El método de $\Delta\Delta Ct$ para el análisis de la expresión de genes consiste en calcular la expresión en medidas arbitrarias teniendo en cuenta el *Ct* obtenido de las reacciones de PCR en tiempo real. Así se aplica la siguiente fórmula de cálculo de expresión génica:

$$\text{Exp} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_m - \Delta Ct_{cb}$$

dónde el ΔCt_m es el valor de ΔCt de las muestras a ser evaluadas; y el ΔCt_{cb} es el valor de ΔCt de las muestras calibradoras (genes de referencia, *CBLP*, *BTUB* y *UBCX*).

Cada reacción se analizó por triplicado técnico y, además, se estudiaron 3 réplicas biológicas independientes para cada tratamiento. Las muestras tratadas se expresaron con respecto al control correspondiente para determinar la diferencia en la transcripción en

respuesta a la exposición a la atrazina.

Tabla 2. Genes, abreviaturas y *primers* utilizados para los análisis RT-qPCR en *C. reinhardtii*.

Nombre del gen	Abreviatura	Secuencia del <i>primer</i>	Eficiencia (%)	Longitud del amplicon (bp)	Referencia
G protein beta subunit-like polypeptide	CBLP	Forward 5' GCC ACT CCC TGT AAA TGC C 3'	93,2	88	Sanchez et al., 2015
		Reverse 5' CTC CTC CTA AAC CCC TCC AG 3'			
Ubiquitin-conjugating enzyme E2	UBCX	Forward 5' ATA CAC AAC CAC GAT GAC GAT 3'	96,6	95	Sanchez et al., 2015
		Reverse 5' TTG CGT GTG TCC TCT CAT CA 3'			
Beta tubulin 2	BTUB	Forward 5' CCC CCG CCT GCA CTT CTT C 3'	94,3	133	Idoine et al., 2014
		Reverse 5' GTC GGC GGC GCA CAT CAT 3'			
Ascorbate peroxidase	APX-1	Forward 5' AGT TGT GTA GTG GGT GGC AG 3'	103,2	100	Sanchez et al., 2015
		Reverse 5' CGG TAT GAT GAT AAG GGT TCG CA 3'			
Catalase	CAT	Forward 5' CAG GAG GCT GCA GGAAA CT 3'	93,4	109	Sanchez et al., 2015
		Reverse 5' ATG ACAACA TGT ACA TTA CGC GG 3'			
Mn-superoxide dismutase	SOD-1	Forward 5' TGT CAG TTT TGT TTC CCT CGT 3'	92,3	108	Sanchez et al., 2015
		Reverse 5' CTT TCA TGT TCC TCG CCA GC 3'			
Glutathione peroxidase	GPX	Forward 5' CTG TTG CGG TTG TCC TGC TC 3'	95,1	119	Sanchez et al., 2015
		Reverse 5' GCC AGC CCC TAC GAT ACA AG 3'			
Glutathione S-transferase	GST	Forward 5' GCT AGC AAG GCAAAA CTC TTT 3'	97	106	Sanchez et al., 2015
		Reverse 5' GCG TCA CAA TGT CAA TCT GG 3'			

3.9. Análisis de alteraciones a nivel del proteoma

Al igual que para los estudios transcriptómicos, para llevar a cabo el estudio de las potenciales alteraciones del proteoma en la microalga *C. reinhardtii*, los cultivos microalgales se expusieron a diferentes concentraciones del herbicida durante 3, 24 y 96 h. En base a los resultados obtenidos por FCM se eligió la concentración de 0,25 μM , que es aproximadamente la EC_{50} para el crecimiento tras 96 h de exposición a atrazina. Además a esta concentración la viabilidad celular no se vio afectada.

La extracción de proteínas se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Damerval et al. (1986) con alguna modificación. Se parte siempre de un *pellet* con una densidad celular conocida, 10×10^7 células, al cual se le añade tampón Tris HCl 50mM con NaCl 150 mM a pH 8,8 para poder sonicar las muestras. Después de la ruptura celular mecánica se añade TCA-

Acetona (10% TCA, 0,07% de 2-mercaptoetanol en acetona fría) para desnaturalizar y precipitar las proteínas, aunque la acetona también permite la solubilización de lípidos, pigmentos y terpenoides. Se dejan incubando las muestras toda la noche a -20°C y al día siguiente se centrifugan las muestras. El *pellet* se lava varias veces con una solución de 0,07% de 2-mercaptoetanol en acetona fría para eliminar los pigmentos y los lípidos que pueda contener la muestra y para eliminar la acidez provocada por el TCA que puede impedir la recuperación de la proteína. Se centrifuga de nuevo y se deja evaporar toda la acetona del *pellet*. A continuación se resuspende el *pellet* en un tampón de solubilización con 30 mM de Urea, 2 M de Thiourea y 4% de 3-[(3-Colamidopropil)- dimetilamonio]-propano sulfonato (3-[(3-Cholamidopropil)dimethylAmmonio]-1-propanesulfonate, CHAPS), se centrifuga por última vez y se trasvasa el sobrenadante donde estarán las proteínas solubilizadas a tubos limpios.

Posteriormente se determina la concentración proteica de las muestras mediante el método de Bradford modificado con ácido clorhídrico para reducir las interferencias causadas por la Urea del tampón de solubilización (Ramagli y Rodriguez, 1985). La absorbancia se mide a 595 nm frente a un blanco de tampón de solubilización. Se ha utilizado seroalbúmina bovina (BSA) como proteína estándar para realizar una recta patrón. También se realizó un SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) y una tinción con Coomassie para la visualización de las bandas de proteínas, este paso se lleva a cabo para descartar la degradación de las proteínas después de su extracción.

A continuación se procede al análisis comparativo del proteoma mediante el método iTRAQ (*Isobaric tag for relative and absolute quantitation*). La digestión por tripsina, el etiquetado iTRAQ, la cromatografía líquida, la espectrometría de masas, la identificación de proteínas y la cuantificación se realizaron siguiendo las instrucciones descritas en Fernández-puente et al. (2011) y Gayoso et al. (2014). Estos análisis de proteómica se llevaron a cabo con la colaboración del laboratorio de investigación osteoarticular y de envejecimiento de proteómica ProteoRed/ISCIII del INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña.

Mediante esta metodología, los péptidos obtenidos mediante digestión enzimática de las proteínas obtenidas por la extracción antes mencionada se marcan con una serie de moléculas que poseen todas ellas el mismo tamaño molecular. En su estructura incorporan un marcador (*reporter*) cuya masa varía en una unidad de masa atómica, unido a un grupo funcional que equilibra la diferencia de masa del marcador. El marcador suele ser un derivado de la N-metilpiperacina unido a un grupo carbonilo que actúa como elemento equilibrador. La molécula presenta también en su estructura un grupo reactivo (NHS-éster) que permite su enlace a los

grupos N-terminal del péptido. La determinación cuantitativa diferencial se basa en que todos los péptidos marcados con los reactivos poseerán el mismo tamaño molecular, si bien el tamaño molecular del marcador (*reporter*) dependerá del reactivo utilizado para las diferentes condiciones de obtención de las proteínas. Así los péptidos pueden separarse en virtud de su tamaño mediante HPLC (*High performance liquid chromatograph*) y posteriormente mediante acoplamiento MS/MS (Tandem mass spectrometry) utilizando el MALDI TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) obtener un perfil de doble fraccionamiento. Primero a través de la relación m/z (masa carga) del péptido precursor mediante una ionización suave y posteriormente en una segunda fragmentación más extensiva de este péptido obtendremos su espectro de masas, que contendrá la distribución m/z de los diferentes marcadores empleados, en función de la cual podremos cuantificar diferencias de expresión entre péptidos de los cultivos no expuestos a atrazina y los cultivos expuestos al herbicida.

3.10. Análisis estadístico

Para los análisis de citometría de flujo (FCM), microscopía de epifluorescencia y espectrofotometría en primer lugar, se calcularon las medias y las desviaciones estándar para cada tratamiento a partir de un mínimo de tres experiencias independientes.

Para el tratamiento estadístico de los datos se utiliza el programa estadístico *IBM SPSS Statistic versión 21.0.0*. Para cada experiencia, la hipótesis de que la concentración de herbicida del medio no afecta al parámetro de estudio para cada tiempo fijado de muestreo, se analiza estadísticamente mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Cuando la hipótesis se rechaza, se utiliza el test de Dunnett para analizar de qué forma afecta cada concentración de herbicida al parámetro estudiado. El test de Dunnett se aplica en todos los casos al nivel de significación 0,05 ($p \leq 0,05$).

Las gráficas se crearon con el paquete de análisis estadístico y de gráficas avanzadas *SigmaPlot* versión 9.0. En las tablas y figuras, los resultados se expresan como la media de los valores obtenidos \pm desviación estándar.

Para el análisis proteómico, se utilizó el paquete estadístico *ProteinPilot 4.0 software* (AB Sciex). Se aplicó un intervalo de confianza del 95%. Se utilizó la base de datos de proteínas de *Chlamydomonas* v5.3 (con 19529 secuencias de proteínas, *Phytozome*) para identificar las proteínas. Después de la búsqueda se aceptaron los IDs que presentaron un *ProteinPilot Unused Score* de al menos 1.3 (correspondiente a un intervalo de confianza del 95%). Los datos fueron normalizados para la carga de error por sesgo y la corrección de fondo se calculó utilizando el *Pro Group algorithm* (ABSciex). Para el análisis proteómico sólo se tuvieron en

cuenta aquellas proteínas con un ratio $\leq 0,8$ o $\geq 1,2$ y p -valor $\leq 0,05$.

Para el estudio del transcriptoma por RNA-Seq se realizaron los análisis bioinformáticos pertinentes utilizando el programa edgeR 3.8.5 para el análisis de expresión diferencial de los genes. Para su análisis sólo se tuvieron en cuenta aquellos genes con un *False Discovery Rate* (FDR) $\leq 0,01$ y un *Log2 Fold Change* (LFC) ≥ 1 o ≤ -1 .

A continuación se clasificaron manualmente los genes y proteínas expresados diferencialmente por categorías de funciones utilizando la información de *Ensembl Plants 22 Chlamydomonas reinhardtii v3.1*. Se organizaron los genes en 13 categorías de funciones: desconocida, otra, metabolismo, ciclo celular, expresión génica, fotosíntesis, energía, aminoácidos, lípidos, regulación, especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés, Redox y proteasas. A su vez dentro de estas categorías los genes se agruparon en subcategorías (Hemschemeier et al., 2013, Lopez et al., 2011).

4. Capítulos

Toxicidad ejercida por
contaminantes acuáticos sobre
microalgas de agua dulce



4.1. Capítulo I: “*Early alterations on photosynthesis-related parameters in Chlamydomonas reinhardtii cells exposed to atrazine: A multiple approach study*”

Los productos químicos, como los herbicidas, han aumentado en el medio acuático debido al incremento de la actividad antropológica y presentan en la actualidad un problema grave a nivel ecológico. Estos productos orgánicos tóxicos se liberan en el medio ambiente acuático y pueden afectar a especies no diana, como las microalgas que se encuentran en la base de la cadena trófica, de modo que cualquier agente externo que las perturbe puede ocasionar un desequilibrio mayor en los niveles superiores de la cadena provocando modificaciones funcionales y estructurales permanentes en los ecosistemas. Uno de los herbicidas más ampliamente utilizados en la agricultura a nivel mundial es la atrazina que inhibe la fotosíntesis bloqueando el proceso de transporte de electrones en el fotosistema II.

En un escenario de cambio climático con un aumento dramático en los niveles de CO₂, es muy importante conocer el comportamiento de los organismos fijadores de carbono. Así, el objetivo del presente estudio fue determinar alteraciones en los parámetros directa o indirectamente relacionados con fotosíntesis después de sólo 3 horas de exposición al herbicida atrazina (0,25 µM, la EC₅₀ para el crecimiento a las 96 h). Para ello, se aplicaron diferentes enfoques metodológicos. Se llevaron a cabo estudios espectrofotométricos para cuantificar los pigmentos celulares, clorofila *a* y *b* y carotenoides. También mediante la citometría de flujo (FCM) se estudió la autofluorescencia celular sin la necesidad de ningún fluorocromo. Además, se estudió el nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células microalgales, en concreto se analizó el nivel de ión superóxido mediante FCM con el fluorocromo hidroetidina (HE). Para los estudios transcriptómicos se llevaron a cabo extracciones de RNA a las 3 h de exposición al herbicida para construir una librería de DNAC y realizar una secuenciación, RNA-Seq, con la finalidad de conocer los genes que están expresados diferencialmente en los cultivos expuestos atrazina con respecto a los cultivos control. Finalmente en los estudios proteómicos se llevaron a cabo extracciones de proteínas después de 3 h de exposición a atrazina, se realizó una digestión con tripsina, un marcaje con iTRAQ y una cromatografía líquida. Finalmente se realizó una espectrometría de masas y se identificaron y cuantificaron las proteínas. Los genes y proteínas diferencialmente expresados fueron clasificados manualmente en categorías de funciones, empleando la información de *Ensembl plantas 22 C. reinhardtii v3.1*. Además, se realizaron análisis de enriquecimiento GO (ontología del Gen) con la herramienta de anotación funcional de algas en <http://pathways.mcdb.ucla.edu/algall/index.html>.

Tras 3 h de exposición a atrazina, los estudios espectrofotométricos y por FCM mostraron un descenso significativo en la cantidad de pigmentos celulares y un descenso significativo de la fluorescencia de la clorofila *a*, respectivamente. Estos resultados sugieren una reducción de la actividad fotosintética debido al mecanismo de acción del herbicida sobre la proteína D1 del fotosistema II, afectando al estado fisiológico y al crecimiento celular. Por FCM también se detectó un aumento significativo de ROS. El estrés oxidativo generado por el mecanismo de acción de la atrazina provocaría desequilibrios redox, alteraciones en la regulación de los genes y en la síntesis de proteínas, lo que conlleva a una disminución general de la actividad celular y cambios en la eficiencia fotosintética. Los datos de RNA-Seq mostraron 9 genes expresados diferencialmente con respecto al control tras 3 h de exposición a atrazina relacionados al proceso de fotosíntesis. 6 de los 9 genes (*LHCBM8*, *LHCSR3*, *LI818R-1*, *PTOX2*, *CAH4* y *CAH5*) estaban subexpresados y 3 aparecen sobreexpresados (*HLA3*, *LCIA* y *ELI3*). Los transcritos que codifican genes para la recolección de luz, el mecanismo de concentración de carbono o proteínas de unión a clorofilas son menos abundantes en las células de los cultivos expuestos durante 3 h. Esto se relaciona con los datos obtenidos anteriormente donde se observó un descenso de la autofluorescencia celular y un descenso de la cantidad de pigmentos. Sin embargo, algunos transcritos aparecen sobreexpresados en los cultivos expuestos, lo que se puede interpretar como una respuesta de aclimatación del organismo fotosintético al estrés provocado por el herbicida. La técnica de RNA-Seq permite el estudio de respuestas rápidas al estrés, pero también es importante considerar las alteraciones tempranas en el perfil proteómico, dicho perfil reveló 5 proteínas que son significativamente menos abundantes en los cultivos expuestos (*CA2*, *PSBO*, *PSB1*, *PRK1*, *ATPD*). Los cambios en el perfil proteómico que se detectan después de sólo 3 h de exposición al herbicida son principalmente debidos al estrés causado directamente por la atrazina sobre las proteínas, y no debido a un cambio en los procesos reguladores de la expresión génica.

En definitiva, una concentración subletal de atrazina (0,25 μ M) altera el perfil transcriptómico y proteómico de células de *Chlamydomonas reinhardtii* tras 3 h de exposición al herbicida. La presencia de la atrazina conduce a un aumento en los niveles celulares de ROS que pueden estar relacionados con una disminución en el contenido de clorofila y, por tanto, una disminución en la actividad fotosintética que puede volver a provocar la producción de ROS, formando un bucle. Además, este herbicida provoca desajustes fotosintéticos en las células de *C. reinhardtii* basadas en las alteraciones observadas en el perfil transcriptómico, así como la desaparición de algunas proteínas relacionadas con la fotosíntesis. Por un lado, los niveles de transcritos que codifican para proteínas de la clorofila, componentes del PSII y anhidrasa carbónica, que ayudan a aumentar la concentración de CO₂ en el cloroplasto, se

redujeron. Por otra parte, algunos transcritos que codifican para transportadores de carbono inorgánico (Ci) fueron sobreexpresados como una respuesta celular para aclimatarse al estrés provocado por el herbicida. También se observa que la cantidad de proteínas que forman parte del PSII, una cloroplasto ATP sintasa y una anhidrasa carbónica que participa en la regulación del proceso de fijación de carbono, disminuyen debido al estrés provocado por este herbicida. Los análisis transcriptómicos y proteómicos han permitido profundizar en la comprensión de los ajustes fotosintéticos que se producen durante la exposición del herbicida. La inhibición de la fotosíntesis inducida por la toxicidad de la atrazina afectará al estado fisiológico y bioquímico de las células microalgales. Teniendo en cuenta estos resultados, el aumento de algunos contaminantes en los sistemas acuáticos podría conducir a una disminución dramática en la fijación del CO₂ a nivel mundial.



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Early alterations on photosynthesis-related parameters in *Chlamydomonas reinhardtii* cells exposed to atrazine: A multiple approach study



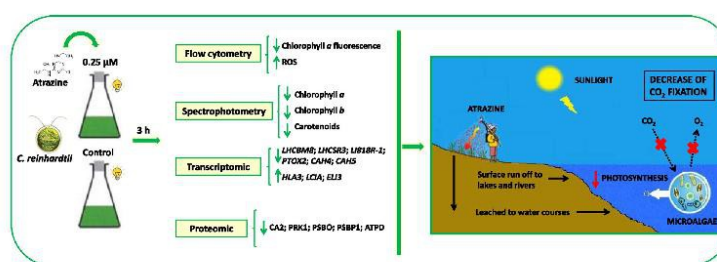
Marta Esperanza, Marta Seoane, Carmen Rioboo, Concepción Herrero, Ángeles Cid*

Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña, Campus de A Zapateira, s/n 15071 A Coruña, Spain

HIGHLIGHTS

- Pigment content and chlorophyll *a* fluorescence decreased in atrazine exposed cells.
- Atrazine induced an increase of reactive oxygen species level in treated cells.
- RNA-Seq analysis showed 9 differentially expressed photosynthesis-related genes.
- Proteomic analysis revealed changes in 5 proteins related to photosynthesis.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 December 2015
 Received in revised form 18 February 2016
 Accepted 18 February 2016
 Available online xxxx

Editor: D. Barcelo

Keywords:

Microalga
 Atrazine
 Flow cytometry
 iTRAQ
 MALDI
 RNA-Seq

ABSTRACT

Chlamydomonas reinhardtii cells were exposed to a sublethal concentration of the widespread herbicide atrazine for 3 h. Physiological cellular parameters, such as chlorophyll *a* fluorescence and oxidative stress monitored by flow cytometry and pigments levels were altered in microalgal cells exposed to 0.25 μM of atrazine. Furthermore, the effects of this herbicide on *C. reinhardtii* were explored using "omics" techniques. Transcriptomic analyses, carried out by RNA-Seq technique, displayed 9 differentially expressed genes, related to photosynthesis, between control cultures and atrazine exposed cultures. Proteomic profiles were obtained using iTRAQ tags and MALDI-MS/MS analysis, identifying important changes in the proteome during atrazine stress; 5 proteins related to photosynthesis were downexpressed. The results of these experiments advance the understanding of photosynthetic adjustments that occur during an early herbicide exposure. Inhibition of photosynthesis induced by atrazine toxicity will affect the entire physiological and biochemical states of microalgal cells.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: a.u., arbitrary units; CCM, carbon concentrating mechanism; Ci, inorganic carbon dioxide; CHAPS, 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate; EB, etidium bromide; FCM, flow cytometry; FDR, false discovery rate; FS, forward scatter light; HE, hydroethidine; iTRAQ, isobaric tags for relative and absolute quantitation; LFC, \log_2 fold change; MALDI-TOF-MS, matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; PSII, photosystem II; ROS, reactive oxygen species; RPM, reads per million mapped reads; SS, side scatter light; TCA, tricarboxylic acid cycle.

* Corresponding author.

E-mail address: angeles.cid@udc.es (Á. Cid).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.175>
 0048-9697/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The occurrence of anthropogenic stress-induced chemicals, such as herbicides, in the aquatic environment presents a serious problem. These man-made organic toxicants are released into the aquatic environment and can affect non-target species. One of the herbicides most extensively applied in agriculture all over the world is atrazine. Its widespread application, persistence, and mobility have led to its frequent detection in ground and surface water sources (Hayes et al., 2010) and to list it as priority substance under the European Water Framework Directive as described in Directive 2013/39/EC (European Council, 2013). Atrazine inhibits photosynthesis blocking the photosynthetic electron transport at photosystem II (Rutherford and Krieger-Liszka, 2001) and thereby energy production drops, preventing CO₂ fixation in target and non-target organisms. Atrazine-induced detrimental effects on the aquatic ecosystem and alterations in aquatic community structure have been reported previously (Choi et al., 2012; Didur et al., 2012; Sjollem et al., 2014; Weiner et al., 2004).

Microalgae have been recommended as test organisms in ecotoxicological studies because of their ecological relevance and sensitivity (Ma et al., 2006). All primary producers are the basis of the aquatic food web; therefore it is an interesting study of their photosynthetic state since any disturbance in productivity of the microalgae community can induce direct structural changes in the rest of the ecosystem (Campanella et al., 2001; Martinez et al., 2014; Rioboo et al., 2007). Regarding toxicity investigations and risk assessment with microalgae, integral endpoints, such as growth and reproduction, are traditionally monitored. However, before these endpoints show a significant change, the exposure may affect other cellular physiological parameters at much lower toxicant concentrations (Nestler et al., 2012).

The photosynthetic state of microalgae can be measured by quantifying the pigment content, which has been used as biomarker of exposure to herbicides in algae (Couderchet and Vernet, 2003). Fluorescence measurements have also been proposed as simple, rapid and sensitive methods to detect the photoinhibitory effects of environmental stressors on phytoplankton (Geoffroy et al., 2007; Juneau et al., 2002). Flow cytometry (FCM) is an alternative to the standard algal population based endpoints, since it allows the characterization of the microalgal response at a single-cell level close to *in vivo* conditions. The *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence of green algae can be used as a tool to detect negative alterations on photosynthesis (Bi Fai et al., 2007; Chalifour et al., 2009; Cid et al., 1995; Ekelund and Aronson, 2007; González-Barreiro et al., 2004; Prado et al., 2011).

Currently, with the development of the omics, new alternatives arise to study the effects of pollutants on microalgae (Dowling and Sheehan, 2006; Esperanza et al., 2015; Jamers et al., 2009; Monsinjon and Knigge, 2007). Transcriptomics and proteomics can be used to detect and characterize responses to external stimulus, and have a great potential for investigating stress mechanisms and responses affecting growth and other physiological and biochemical endpoints (Jamers and de Coen, 2010; Nestler et al., 2012; Subramanian et al., 2014), being increasingly applied in ecotoxicology and other fields of biological science. The availability of the sequenced genome of the microalgal species *Chlamydomonas reinhardtii*, with adequate annotation and metabolic pathway information, facilitates high-throughput analyses of transcriptional and proteomic profiling (Merchant et al., 2007).

Previous research has demonstrated that *C. reinhardtii* cells exposed to atrazine change their metabolism and get energy mainly by heterotrophic pathways (Esperanza et al., 2015). In a global climate change scenario with a dramatic increase in CO₂ levels, it is very important to know the behavior of carbon fixing organisms. Thus, the aim of the present study was to determine alterations in parameters directly or indirectly related to photosynthesis after only 3 h of exposure to the herbicide. For this purpose, different methodological approaches were applied. First, a traditional spectrophotometric method for the quantification of pigments content was carried out. Additionally, flow

cytometry was used to determine chlorophyll *a* fluorescence and reactive oxygen species level (ROS). Moreover, unlike standard ecotoxicity studies, detailed quantitative transcriptomic profiling of algal cells exposed to atrazine compared with those cultured without herbicide was assessed, looking for changes in the regulation of transcription. Furthermore, a proteomic analysis was carried out to observe early protein alterations due to the stress directly caused by the herbicide.

2. Materials and methods

2.1. Microalgal cultures

The unicellular green alga *C. reinhardtii* Dangeard (strain CCAP 11/32A mt+) was obtained from the Culture Collection of Algae and Protozoa of Dunstaffnage Marine Laboratory (Scotland, UK). *C. reinhardtii* cells were cultured in Tris-minimal phosphate medium (Harris, 1989) on a rotary shaker set at 150 rpm, under controlled conditions: 22 ± 1 °C and illuminated with 100 μmol photon m⁻² s⁻¹ under a 12:12 h light:dark cycle. Cells in mid-logarithmic growth phase were used as inoculum for the different assays. Initial cell density for each experiment was 2 × 10⁵ cells mL⁻¹.

Before each experiment, fresh stock solutions of atrazine were prepared by dissolving the pure compound (Sigma-Aldrich, MW: 215.68) in methanol and filtering through 0.2 μm membrane filters. Also control cultures were included, to which only methanol was added. No significant differences between nominal and effective concentration of atrazine were found using a gas chromatography/mass spectrometry analysis.

All cultures were set up in triplicate for 3 h and at least two independent experiments were carried out for each parameter analyzed. This time point was selected considering previous cytometry studies where the effects of atrazine were analyzed every hour during 24 h and changes in the cellular metabolic activity and ROS formation were detected after 3 h of atrazine exposure (unpublished data).

2.2. Growth measurement

A growth inhibition test for *C. reinhardtii* using atrazine concentrations ranged from 0.1 to 2 μM was carried out to determine the herbicide concentration used for the following determinations of the present study. Cell density was daily determined for 96 h by counting culture aliquots in the flow cytometer. For absolute cell counting, a suspension of fluorescent polystyrene microspheres (Flow-Count Fluorospheres; Beckman Coulter) with known concentration was added as an internal reference to all cell samples. Growth rates (μ) expressed as day⁻¹ were calculated via the formula $\mu = [\ln(N_t) - \ln(N_0)] / \ln 2(t - t_0)$ where N_t is the cell density at time t and N_0 is the cell density at time 0. The 96 h EC₅₀ value for growth was calculated, based on growth rate data, using the computer program CompuSyn (Chou and Martin, 2005).

2.3. Photosynthetic pigment content

Pigments were extracted from a concentrated algal sample in a 90% acetone aqueous solution and determined by measuring the absorbance of the extract using a Shimadzu UV-1700 spectrophotometer at appropriate wavelengths (664, 647 and 480 nm). The resulting absorbance measurements were translated to chlorophylls and carotenoids according to Jeffrey and Humphrey (1975) and Strickland and Parsons (1972), respectively. The equations used to calculate the pigment concentrations in the extract are:

$$\text{Chlorophyll } a = 11.93 A_{664} - 1.93 A_{647}$$

$$\text{Chlorophyll } b = 20.36 A_{647} - 5.50 A_{664}$$

$$\text{Carotenoids} = 4.0 A_{480}$$

where total chlorophylls *a* and *b* and carotenoids represent the pigment concentrations of extract in $\mu\text{g mL}^{-1}$, and A664, A647 and A480 represent the absorbances measured at 664, 647 and 480 nm, respectively.

2.4. Flow cytometry analyses

FCM analyses of *C. reinhardtii* cells were performed on a Beckman Coulter Gallios flow cytometer fitted with 488 nm and 633 nm excitation lasers, detectors of forward (FS) and side (SS) light scatter and four fluorescence detectors corresponding to different wavelength intervals: 505–550 nm (FL1), 550–600 nm (FL2), 600–645 nm (FL3) and >645 nm (FL4). The 488-nm argon-ion laser was used as excitation source for all the probes assayed. Forward scatter (FS, an estimation of cell size) and red autofluorescence (FL4 channel, an estimation of cell chlorophyll *a* content) dot-plots were used to characterize the microalgal population, setting gating levels in order to exclude non-microalgal particles. At least 10 000 gated cells per sample were collected and analyzed using Kaluza software version 1.1 (Beckman Coulter). All FCM determinations were performed at least twice and duplicate samples were run on the flow cytometer.

2.4.1. Inherent cell properties: chlorophyll *a* fluorescence

The red autofluorescence of *C. reinhardtii* cells, related to chlorophyll *a* fluorescent emission, was analyzed to study the potential changes in this pigment content or changes in the functioning of the PSIII. Results were expressed as the mean red fluorescence in the FL4 channel fluorescence intensity in a.u. (Prado et al., 2011).

2.4.2. Oxidative stress determination

Oxidative stress in *C. reinhardtii* was evaluated by FCM using determinations of intracellular levels of superoxide anion radical (O_2^-) with an oxidation-sensitive fluorescent dye, hydroethidine (HE; Molecular Probes, Inc.). HE was added at a final concentration of 16 μM for 30 min to the cell suspensions (2×10^5 cells mL^{-1}). Results were expressed as the mean orange-ethidium bromide (EB) fluorescence in the FL3 channel fluorescence intensity in a.u. (Prado et al., 2012a).

2.5. Total RNA extraction and RNA-Seq

RNA was isolated from control and atrazine exposed (0.25 μM) cells after 3 h of atrazine exposure, using the reagent NZYol (NZYTech), following the procedure described previously in Esperanza et al. (2015).

Then a cDNA library construction and Illumina HiSeq 2000 sequencing were done with the collaboration of AllGenetics & Biology, SL. A total number of 4 cDNA libraries were constructed, one per sample (2 control and 2 treated samples), using the TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 (Illumina), strictly following the manufacturer's instructions and the pool was sequenced in a HiSeq 2000 PE100 lane.

2.6. Protein extraction, identification and quantifying

The protein extraction was carried out following the protocol of Damerval et al. (1986) with some modifications. Cells were harvested by centrifugation to get a pellet of 10×10^7 cells, pellet was resuspended in an extraction buffer (50 mM Tris HCl, pH 8.8 with 150 mM NaCl), suspended cells were lysed by sonication. For TCA/acetone method, samples were centrifuged and supernatants were taken in fresh tubes and mixed with 10% of trichloroacetic acid (TCA) in cold acetone with 0.07% of β -mercaptoethanol to 0.07%. This mixture was incubated at 20 °C overnight. After this time, the mixture was centrifuged and the precipitate was washed 3 times with a cold mixture of acetone and 0.07% of β -mercaptoethanol, with their respective centrifugations. Then the pellet was allowed to dry. Finally, the pellet was resuspended in a solubilization buffer (30 mM Tris, 8 M Urea, 2 M thiourea and 4% of CHAPS).

Protein concentration of samples was determined by the Bradford method modified by Ramagli and Rodriguez (1985). The absorbance was measured in a spectrophotometer at 595 nm against a blank of solubilization buffer, using Bovine serum albumin (BSA) as a standard.

Trypsin digestion, iTRAQ labeling, liquid chromatography, mass spectrometry, protein identification and quantifying were performed as previously described in Fernández-Puente et al. (2011) and Gayoso et al. (2014). These proteomic analyses were carried out with the collaboration of the Osteoarticular and Aging Research Lab, Proteomics-ProteoRed/ISCIII, INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña.

2.7. Statistical analyses

For the photosynthetic pigment content and FCM data, mean values \pm standard deviation (SD) of at least two experiments were statistically analyzed by an overall one-way analyses of variance (ANOVA) using SPSS Statistic software (version 21.0, SPSS, IBM). A *p*-value of <0.05 was considered statistically significant. When significant differences were observed, means of treated cultures were compared with control means using the Dunnett test.

For the RNA-Seq data, the bioinformatic analysis was carried out by ECSEQ Bioinformatics, using the "edgeR 3.8.5" program for the analysis of differential expression of the genes. Only genes with a "false discovery rate" (FDR) \leq 0.01 and a " \log_2 fold change" (LFC) \geq 1 or \leq -1 were selected.

For proteomic analysis, the normalization tools and statistical package from ProteinPilot 4.0 software (AB Sciex) were employed. A stringent >95% confidence interval was applied (equivalent to ProteinPilot Unused score > 1.3). Spectra were searched against the *Chlamydomonas* protein database v5.3 (19,529 Protein Sequences downloaded from Phytozome). After searching, protein IDs that had a ProteinPilot Unused Score of at least 1.3 (corresponding to a 95% Confidence Interval) were accepted. The ProteinPilot software also calculated a confidence percentage, the unused score, which reflects the probability of a hit being a "false positive," at a 95% confidence. Although this software automatically accepts all peptides with an identification level of >1%, only proteins having at least one peptide above the 95% confidence level were initially recorded. Searches against a concatenated database containing both forward and reversed sequences allowed the false discovery rate to be kept at 1%. Data were normalized for loading error by bias and the background correction was calculated using the Pro Group algorithm (ABSciex). A *p* \leq 0.05 or a ratio of \geq 1.2 or \leq 0.8 was considered significant (over- or underexpressed).

Then, differentially expressed genes and proteins were classified manually by categories of functions previously described in Hemschemeier et al. (2013), using information from Ensembl Plants 22 *C. reinhardtii* v3.1. Furthermore, GO (Gen Ontology) enrichment analyses were performed using the Algal Functional Annotation Tool at <http://pathways.mcdb.ucla.edu/algal/index.html> (Lopez et al., 2011).

3. Results and discussion

3.1. Growth

Growth data indicated that atrazine treatment induced a significant (*p* < 0.05) inhibitory effect on the proliferation of *C. reinhardtii* in a concentration-dependent manner (Table 1). Control cultures showed significantly (*p* < 0.05) higher cell numbers per mL medium and higher average growth rates than the atrazine exposed population after 96 h (Table 1). The EC_{50} for growth after 96 h value, based on growth rate data was 0.231 μM . Then, the sublethal atrazine concentration used in the following analyses of the present study was 0.25 μM , a concentration close to this 96 h EC_{50} value.

3.2. Photosynthetic pigment content and chlorophyll *a* fluorescence

After 3 h of exposure to a sublethal atrazine concentration (0.25 μM), chlorophyll *a* and total carotenoid contents of *C. reinhardtii* biomass were significantly reduced ($p < 0.05$) with respect to control cultures, 26.7% and 29.4%, respectively (Fig. 1). However a non-significant reduction (19.1%, $p > 0.05$) in the cellular amount of chlorophyll *b* was observed in cultures exposed to atrazine (Fig. 1).

FCM data showed a significant reduction ($p < 0.05$) of 16.6% of the chlorophyll *a* fluorescence (2065 ± 35.36 a.u.) with respect to control cultures (2475 ± 77.78 a.u.) after 3 h of exposure to the herbicide (Fig. 2A).

Chlorophyll *a* fluorescence is a function of the cell pigment content and the photochemical activity of PSII in the photosynthetic electron transport chain (Franklin et al., 2001). Thus, in this study, the observed reduction of the autofluorescence can be explained by the decrease in cellular pigment content.

Furthermore, chlorophyll *a* fluorescence emission analysis of PSII from the photosynthetic apparatus of algae makes possible the characterization of the effects and modes of action of different kinds of environmental stressors and water pollutants such as herbicides (Brack and Frank, 1998). Obtained results indicated a reduction of photosynthetic activity and this is related to the atrazine mechanism of action on the D1 protein of PSII (Chalifour et al., 2009; Didur et al., 2012). Photosynthesis inhibition induced by atrazine toxicity will affect the entire physiological state and cell growth process (Bi Fai et al., 2007; Esperanza et al., 2015).

These results, decrease in the cellular pigment content and the reduction of the chlorophyll *a* fluorescence caused by atrazine (Figs. 1 and 2A), are in accordance with results obtained in previous studies in which it is reported that microalgal cells, under the stress induced by this herbicide, change their photoautotrophic metabolism, inefficient under these conditions, to an heterotrophic metabolism (Esperanza et al., 2015; González-Barreiro et al., 2004).

3.3. Oxidative stress

In order to test the relationship between atrazine treatment and oxidative stress induction in *C. reinhardtii*, FCM analysis of reactive oxygen species (ROS) generation level was evaluated. The exposure to atrazine caused a remarkable accumulation of ROS in *C. reinhardtii* cells, resulting in a significant increase ($p < 0.05$) in the intracellular level of superoxide anion radical (O_2^-) in treated cultures (46.95 ± 0.83 a.u.) with respect to control cultures (34.70 ± 0.99 a.u.) (Fig. 2B). This increase in cellular ROS level is related to the reduction of pigments and autofluorescence, since it has been well documented that a photosynthetic efficiency decrease can enhance ROS production in microalgal cells, followed by oxidative damages and function abnormalities (Liu et al., 2012).

Although ROS were classically considered toxic metabolic byproducts that ultimately lead to cell death, it is now recognized that ROS act as central secondary messengers involved in compartmentalized signaling networks (Rosenwasser et al., 2014). This function suggests that cells have evolved strategies to utilize ROS as biological signals that control

Table 1

Effect of atrazine on the growth of *C. reinhardtii* cells after 96 h of exposure. Values are shown as mean \pm SD of experimental triplicates. Asterisks (*) indicate significant differences ($p < 0.05$) versus non-treated control.

Atrazine (μM)	Cell density (cells $\times 10^4$ mL $^{-1}$)	Growth rates (μ) (day $^{-1}$)
Control	457.50 \pm 20.30	1.13 \pm 0.02
0.1	256.00 \pm 11.46*	0.92 \pm 0.02*
0.25	74.90 \pm 1.30*	0.48 \pm 0.01*
0.5	56.20 \pm 0.85*	0.37 \pm 0.01*
1	22.50 \pm 0.40*	0.04 \pm 0.00*
2	20.30 \pm 0.30*	0.01 \pm 0.00*

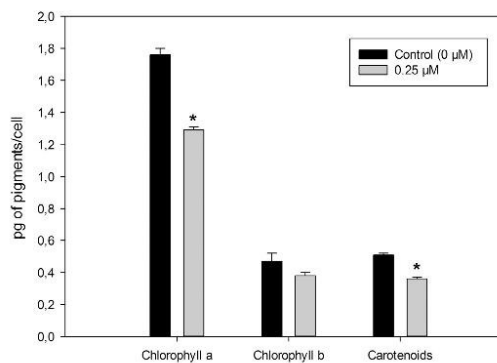


Fig. 1. Photosynthetic pigment content of *C. reinhardtii* cells in control cultures and atrazine exposed (0.25 μM) cultures at 3 h. Photosynthetic pigment content values are shown as mean \pm SD of experimental duplicates, expressed as pg of pigments per cell. Asterisks (*) indicate significant differences ($p < 0.05$) versus non-treated control.

various genetic stress programs. This interpretation is based on the unstated assumption that a given ROS can interact selectively with a target molecule that perceives the increase in ROS concentration, and then translates this information into a change of gene expression, such as changes in transcriptional activity (Laloi et al., 2004).

Results obtained showed a significant increase in intracellular ROS levels in the cultures exposed to atrazine (Fig. 2B). Toxic action involving ROS formation and oxidative stress have been reported in ecotoxicological studies with unicellular algae exposed to atrazine (Qian et al., 2009; Mofeed and Mosleh, 2013), paraquat (Jammers and De Coen, 2010; Nestler et al., 2012; Prado et al., 2012a,b), and metals (Melegari et al., 2013; Perreault et al., 2012). *C. reinhardtii* is sensitive to the oxidative action of atrazine and this can be related to the decrease observed in the cellular content of chlorophyll, as has been reported in plants (Ekmekci and Terzioglu, 2005).

In a previous study with atrazine the cellular activity of microalgal cells was affected significantly at tested concentration, however non-significant changes in cell viability were observed (Esperanza et al., 2015). ROS generated by the mechanism of action of atrazine, as described above, provoked redox misbalances and alterations in gene regulation and protein synthesis, and therefore a general decrease in the cellular activity.

3.4. Transcriptomic analyses

Obtained RNA-Seq data showed 185 differentially expressed genes ($\text{FDR} \leq 0.01$ and $\text{LFC} \geq 1$ or ≤ -1) between control cultures and cultures exposed to atrazine (0.25 μM) at tested time (3 h). These genes were classified manually in 13 categories of functions: photosynthesis, metabolism, gene expression, energy, amino acids, cell cycle, redox, lipids, regulation, ROS and stress, proteases, other and unknown (Hemschemeier et al., 2013). Of this amount of genes, 124 showed a reduction in their expression, while 61 genes showed an increase (Fig. 3).

Besides the large number of altered genes, this study was only focused on those related directly or indirectly to photosynthesis processes (9). Within this category, 6 of the 9 genes (*LHCBM8*, *LHCSR3*, *L1818R-1*, *PTOX2*, *CAH4* and *CAH5*) were significantly downregulated and 3 were significantly upregulated (*HLA3*, *LCIA* and *EU3*) (Table 2).

The *LHCBM8*, *LHCSR3* and *L1818R-1* transcripts encode early light inducible (*LHCBM8*) and stress-related (*LHCSR3* and *L1818R-1*) chlorophyll *a/b* binding proteins that play a key role in the light-harvesting complex. In this study all of these transcripts were significantly downregulated (Table 2). In eukaryotic oxygenic photosynthetic organisms, light-harvesting chlorophyll *a/b* binding proteins function

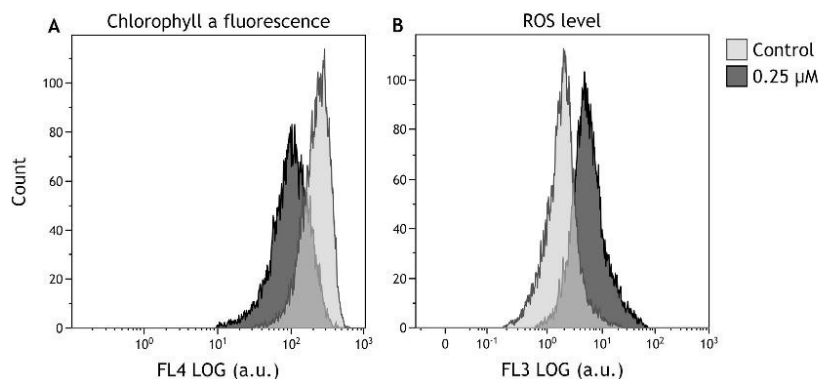


Fig. 2. Overlay histograms of flow cytometric analysis of chlorophyll *a* autofluorescence (A) and intracellular levels of superoxide anion radical (B) of *C. reinhardtii* cells in control cultures and atrazine exposed (0.25 μM) cultures at 3 h. (Y-axis: count; X-axis: fluorescence intensity in arbitrary units, a.u.).

in the collection and transfer of light energy to the reaction centers of the photosystems II and I. Additionally these proteins are also involved in light dissipation and energy quenching. Therefore, light-harvesting proteins are important components of the photosynthetic machinery that optimize photosynthetic function and minimize photooxidative damage in response to light quantity and quality (Stauber et al., 2003). Maruyama et al. (2014) showed that the transcription of the *LHCSR3* gene, the most downregulated in the current study (Table 2), was suppressed by treatment with a photosystem II inhibitor (DCMU). Bonente et al. (2011) have also shown that *LHCSR3*, essential for energy quenching in *C. reinhardtii*, is a pigment-binding protein with the properties of a constitutive quencher. *L1818R-1* protein has been suggested to play a role in protecting chlorophyll proteins from excitation pressure under low CO_2 as well as high light conditions (Iwai et al., 2007; Richard et al., 2000). The decrease in the level of transcription of these genes in treated cells is in accordance with the mechanism of action of atrazine that inhibits PSII and the decrease in chlorophyll *a* content and its fluorescence (Figs. 1 and 2A).

The *PTOX2* transcript encodes a plastid terminal oxidase 2, the oxidase most predominantly involved in chlororespiration in

Chlamydomonas species (Houille-Vernes et al., 2011). Transcriptomic data revealed that also the amounts of *PTOX2* decrease significantly in this study (Table 2). Chlororespiration has been defined as an alternative respiratory electron transport chain in interaction with the photosynthetic electron transport chain in thylakoid membranes of chloroplasts (Peltier and Cournac, 2002). It works as a valve to dissipate excess NADPH and maintain redox homeostasis. Chlororespiration involves two proteins that have been recently identified in *Chlamydomonas*: a NADPH dehydrogenase (NDA2), and a plastid terminal oxidase (*PTOX2*). NDA2 reduces plastoquinones from NADPH, and *PTOX2* regenerates oxidized plastoquinones at the expense of O_2 . Activity of these two chloroplast enzymes, which act in tandem, results in the oxidation of NADPH and the consumption of O_2 (Johnson and Alric, 2013). Downregulation of *PTOX2* and the observed ROS production can be related to the mechanism of action of atrazine because, as mentioned before, this herbicide blocks the photosynthetic electron transfer to the plastoquinone pool, leading to production of triplet chlorophyll and O_2^- . *PTOX2* is also important for carotenoid biosynthesis during chloroplast biogenesis because its activity prevents the over-reduction of the plastoquinone pool. Plants without this enzyme exhibit phenotypes of variegated leaves with white patches because the carotenoid synthesis pathway slows down due to the lack of oxidized plastoquinone which oxidizes phytoene, a carotenoid intermediate (Carol and Kuntz, 2001). Therefore, the observed downregulation of the *PTOX2* transcript could be related to the decrease in the carotenoid contents (Fig. 1). A lack of *PTOX2* indirectly causes photodamage during plastid development because protective carotenoids are not synthesized (Aluru and Rodermeil, 2004). Excess light captured by the light-harvesting complex of PSII is dissipated by carotenoids. The lack of sufficient amount of carotenoids and chlorophyll (Fig. 1) generates reactive oxygen radicals which in turn lead to the photooxidation of plastid components (Aluru and Rodermeil, 2004). Hence, the decreased amounts of this transcript could also be related to the accumulation of ROS observed in this study in the cultures treated with atrazine (Fig. 2B).

The transcripts *CAH4* and *CAH5* encode beta carbonic anhydrases (CAs) which are zinc-containing metalloenzymes that catalyse the reversible interconversion of CO_2 and HCO_3^- , and these two transcripts were also significantly downregulated in cultures exposed to atrazine (0.25 μM) for 3 h with respect to control cultures (Table 2). Although these beta carbonic anhydrases are localized in the mitochondria (Eriksson et al., 1995, 1996), they could affect chloroplast related processes, being linked to the carbon concentrating mechanism (CCM) (Moroney and Ynalvez, 2007). The role of these mitochondrial CAs has been suggested as buffering matrix H^+ upon the initiation of

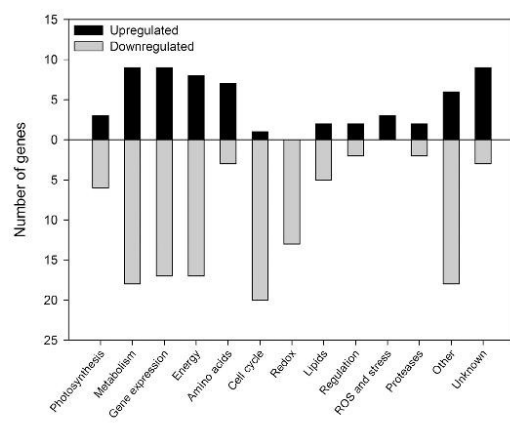


Fig. 3. Differentially expressed genes (FDR ≤ 0.01 and LFC ≥ 1 or ≤ -1) after 3 h of exposure to 0.25 μM of atrazine with respect to the control divided into 13 categories. Separated by a horizontal axis the genes upregulated are in the top and the downregulated are in the bottom.

Table 2

Differentially expressed genes related to photosynthesis of *C. reinhardtii*. Comparison of transcript abundances and fold-changes in cultures exposed to 0.25 μM of atrazine for 3 h vs. control cultures. For each comparison, a gene was deemed differentially expressed if it fitted the following criteria: significant “log₂ fold change” ($\text{LFC} \leq -1$ or ≥ 1) and significant “false discovery rate” ($\text{FDR} \leq 0.01$). RPM means “Reads per million mapped reads”.

Gene ID	Gene name	Average RPM (treatment) 3H	Average RPM (control) 3H	Log ₂ fold change 3H	FDR 3H	Description
Downregulated						
205752	<i>LHCBM8</i>	266.80	595.64	−1.05	0.000119	Chlorophyll <i>a</i> – <i>b</i> binding protein of LHCl
184730	<i>LHCSR3</i>	24.00	168.52	−2.70	4.36e−43	Stress-related chlorophyll <i>a/b</i> binding protein 3
184724	<i>LH18R-1</i>	8.78	29.62	−1.64	5.53e−12	Stress-related chlorophyll <i>a/b</i> binding protein 1
205757	<i>PTOX2</i>	24.18	67.80	−1.37	1.92e−07	Alternative oxidase, plastid terminal oxidase 2
24552	<i>CAH4</i>	272.75	601.41	−1.03	2.23e−05	Mitochondrial carbonic anhydrase, beta type
196876	<i>CAH5</i>	147.79	317.96	−1.00	0.000493	Mitochondrial carbonic anhydrase, beta type
Upregulated						
134058	<i>HIA3</i>	348.89	161.78	1.21	0.00172	ABC transporter, multidrug resistance-related proteins (MRP) subfamily
135648	<i>LCIA</i>	94.31	29.03	1.82	1.48e−10	Low-CO ₂ -inducible membrane protein
148916	<i>ELI3</i>	5.48	2.22	1.40	0.000105	Early light inducible chlorophyll <i>a/b</i> binding protein

photorespiration when the cells are transferred from high to low CO₂ conditions (Eriksson et al., 1996). When subjected to low-CO₂ environments, mitochondria are found to migrate around the periphery of the chloroplast, and CAH4 and CAH5 may function in the capture of CO₂ escaping the chloroplast, rapidly converting these molecules to HCO₃[−], which can be better retained by the cell (Giordano et al., 2003; Moroney et al., 2011; Raven, 2001). Atrazine exposed cells acts like cells grown in dark conditions changing their autotrophic metabolism (Esperanza et al., 2015), according to results obtained by Hemschemeier et al. (2013) when *C. reinhardtii* cells were studied under anoxic and dark conditions. Since the CCM is only activated in the presence of light, enzymes related to this process, such as CAH4 and CAH5, were expected to be downregulated (Tirumani et al., 2014).

RNA-Seq data also revealed the upregulation of three transcripts (*HIA3*, *LCIA* and *ELI3*) (Table 2). *HIA3* and *LCIA* were identified as C_i transporters candidates. *HIA3* (high light-induced gene 3, also known as Mrp1 for multidrug resistance-related protein 1) has been annotated as a putative ATP-binding cassette-type transporter, containing a single ABC-MRP domain and it was predicted to be localized to the plastid membrane (Winck et al., 2013). *LCIA*, also known as Nar1.2, was identified as a limiting-CO₂-inducible gene in a large-scale analysis of gene expression profiles in *C. reinhardtii* (Miura et al., 2004). *LCIA* has six predicted transmembrane domains, and possesses a domain of the formate/nitrite transporter protein family. Members of this protein family have been identified in the genome of prokaryotes, yeast and green algae *Chlamydomonas*, *Chlorella* and *Volvox*. It has been reported *HIA3* increases in *C. reinhardtii*, under low CO₂ conditions (Jungnick et al., 2014). *LCIA* was proposed as a candidate C_i transporter localized in the chloroplast membrane of *Chlamydomonas* cells (Winck et al., 2013) rather than a nitrite transporter, as are the remaining *NAR1* gene family members of *C. reinhardtii*, because the expression of *LCIA* is regulated by CO₂ irrespective of the nitrogen source (Miura et al., 2004; Spalding, 2008). RNAi strains with reduced expression of both *LCIA* and *HIA3* grew poorly on low CO₂ (Duanmu et al., 2009).

The *ELI3* transcript encodes an early light inducible chlorophyll *a/b* binding protein (Table 2). *ELIs* such as *ELI3* encode polypeptides with high sequence similarity to the early light-induced proteins (Elips) characterized in vascular plants and to the Cbr protein from *Dunaliella bardawil*. Biochemical studies suggest that Elips bind both chlorophyll and lutein (Adamska, 1997, 2001) and they might function in a photoprotective manner, possibly scavenging chlorophyll molecules during the turnover of light-harvesting complexes (Adamska, 1997, 2001). Hutin et al. (2003) showed that Elips function in photoprotection, either by binding free chlorophyll or chlorophyll-degradation products, or by promoting the proper assembly of pigment protein complexes during exposure of cells to high light. It has been hypothesized that they play a protective role either by transiently binding the excited

free chlorophyll molecules as transient pigment carriers and/or by binding xanthophyll pigments to dissipate the excess absorbed light energy (Adamska, 2001; Havaux, 2003; Hutin et al., 2003; Król et al., 1999; Montané and Kloppstech, 2000). Cbr, the *D. bardawil* homologue of Elips, is induced when algal cells are exposed to stressful conditions, such as high light treatment, sulfur starvation, norflurazon treatment (norflurazon blocks carotenoid biosynthesis) (Lers et al., 1991; Levy et al., 1993) or atrazine treatment. This study also shows that atrazine causes an induction of *ELI3* transcript (Table 2). More recently, *ELIPS* in *Arabidopsis* was proposed to physiologically function in the regulation of chlorophyll concentration in thylakoid membranes: it acts as a chlorophyll sensor that modulates 5-aminolevulinic acid biosynthesis to prevent accumulation of free chlorophyll and hence prevent photooxidative stress (Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007; Zhang et al., 2012).

Transcriptomic results showed that the amounts of various transcripts related to photosynthesis decreased in the cultures exposed to atrazine with respect to control cultures (Table 2). Transcripts encoding for light-harvesting, carbon concentrating mechanism or other chlorophyll binding proteins were reduced in abundance. The general downregulation of genes associated with chlorophyll binding or biosynthesis is supported by the lower chlorophyll contents (Fig. 1) (Chekounova et al., 2001; Duanmu et al., 2013). Hemschemeier et al. (2013) also found this reduction in pigment content in dark-grown *C. reinhardtii* cells. Furthermore, the reduced abundances of transcripts related to photosynthesis would be reflected by the status of the photosynthetic apparatus and the PSII as we can see in FCM results, which show a decrease in the chlorophyll *a* fluorescence (Fig. 2A). *C. reinhardtii* cells exposed to atrazine had lower chlorophyll contents, and exhibited reduced autofluorescence. However, there were a few photosynthesis-related transcripts whose amounts increased (*HIA3*, *LCIA* and *ELI3*; Table 2). In view of these data, it can be assumed that the few photosynthetic transcripts that were accumulated have a role in the acclimation of a photosynthetic organism to the stress provoked by the herbicide.

3.5. Proteomic analyses

RNA-Seq technique allows the study of a rapid response to stress, but it is also important to consider the early alterations in the proteome profile. For this purpose, an iTRAQ peptide labeling experiment was made. Relative abundance of 12 proteins were significantly decreased ($p \leq 0.05$ and expression ratio ≤ 0.8) in cultures exposed to atrazine 0.25 μM , being 5 of them proteins related to photosynthesis (CA2, PSBO, PSB1, PRK1, ATPD) (Table 3).

Photosynthesis and carbon assimilation were also affected by atrazine at the proteomic level. Carbonic anhydrase (CA2 or CAH2), with carbonate dehydratase activity, was significantly decreased in treated cells (Table 3). This protein catalyzes the interconversion

Table 3

Comparison of photosynthesis-related protein abundances in cultures exposed to 0.25 μM of atrazine for 3 h vs. cultures control of *C. reinhardtii* cells. For each comparison, a protein was deemed differentially downregulated if it met the following criteria: 1) significant ratio (≤ 0.8) and 2) significant p -value ($p \leq 0.05$).

Accession number	Protein name	Description	0.25 μM :control	
			Ratio	p -Value
P93109	CA2	Periplasmic carbonic anhydrase, alpha type	0.2466	0.0032
AS1YP4	PRK1, 195910	Phosphoribulokinase	0.4613	0.0029
AS1JE4	PSB0, 130316	Oxygen-evolving enhancer protein 1 of photosystem II	0.5495	0.0010
AS1YH9	PSBP1, 33411	Oxygen-evolving enhancer protein 2 of photosystem II	0.4571	0.0055
AS1JF5	ATPD, atpH, 132678	Chloroplast ATP synthase delta chain	0.4529	0.0430

between carbon dioxide and bicarbonate, playing an important role in carbon fixation, metabolism and Calvin cycle. The interpretation of the physiological function of carbonic anhydrases (CAs) in unicellular algae is difficult due to the presence of multiple CA isozymes and different localizations, as commented above, but at least two alpha CAs are found in the periplasmic space of *Chlamydomonas*, namely CAH1 and CAH2. These proteins facilitate the diffusion of C_i to the plasma membrane (Moroney et al., 2011). In microalgae that possess a carbon concentrating mechanism (CCM), the enzyme located in the chloroplast stroma that has carbonate dehydratase activity (CA2), is needed to convert the accumulated H_2CO_3 to CO_2 , the substrate for Rubisco (Badger and Price, 2003; Huang et al., 2011). Uptake of inorganic carbon as CO_2 or bicarbonate is facilitated in *Chlamydomonas* across all membrane systems of the cell by CCM acting in concert with carbonic anhydrase (Förster et al., 2006).

The enzyme phosphoribulokinase (PRK1) also decreases in cultures exposed to atrazine (Table 3). PRK1 is recognized as an important regulatory protein in the process of carbon fixation. Unique to the Calvin cycle, PRK catalyzes the ATP-dependent phosphorylation of ribulose 5-phosphate, thereby regenerating ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP), the CO_2 acceptor molecule and substrate for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) (McKay et al., 1991).

Moreover, the presence of both proteins encoding PSII components and subunits of the oxygen-evolving complex (OEC) of PS-II (PsbO, PsbP1) were also reduced following herbicide exposure. Furthermore, the levels of the chloroplastic ATP synthase subunit (ATPD), with proton-transporting ATP synthase activity was found to be reduced in cultures exposed to atrazine with respect to the control cultures (Table 3). Thus, under atrazine stress, the algal cells have diminished photosynthetic capacity due to the reduction of components of photosystem II, as well as the plastidic ATP-generating system and this finding is in accordance with the observed significant decrease in the chlorophyll a fluorescence and pigments (Figs. 1 and 2A).

Gene expression is controlled globally and at multiple levels in response to environmental stress (Lackner et al., 2012). As being indicated before, in the aim of this study, changes in the proteomic profile detected after only 3 h of exposure are mainly due to the stress directly caused by the herbicide on proteins, and not due to a change in the regulatory processes of gene expression.

In Esperanza et al. (2015), a significant decline in cellular activity was also observed in the *C. reinhardtii* cells exposed to atrazine and this may be also related to a reduction in the photosynthetic activity (Figs. 1 and 2A). *C. reinhardtii* cells under atrazine stress conditions could change their photosynthetic metabolism to a heterotrophic one, because this herbicide exerts its mechanism of action on the photosystem II (Marchetti et al., 2013; Rutherford and Krieger-Liszky, 2001), thus reducing the photosynthetic activity and due to this reason the microalgal cells try to get energy through heterotrophic metabolism for being able to maintain its viability.

To sum up, the presence of atrazine leads to an increase in the cellular ROS levels that can be related to a decrease in chlorophyll content and, hence, in a decrease in the photosynthetic activity that can enhance the ROS production, as a loop. Furthermore, this herbicide causes

photosynthetic adjustments in *C. reinhardtii* cells based on alterations observed in transcriptomic profile as well as the disappearance of some photosynthesis-related proteins. On the one hand, levels of transcripts encoding for chlorophyll binding proteins, components of the PSII and carbonic anhydrases, which help increase the CO_2 concentration in the chloroplast, were reduced. On the other hand, some transcripts encoding for C_i transporters were upregulated as a cell response to acclimation to stress provoked by the herbicide. Moreover, the amount of PSII component proteins, a chloroplast ATP synthase and a carbonic anhydrase, an important regulatory protein in carbon fixation process, decreased due to the stress caused by this herbicide.

4. Conclusions

A sublethal concentration of atrazine (0.25 μM) alters the transcriptomic and proteomic profile of *Chlamydomonas reinhardtii* cells. Using flow cytometry protocols a decrease in chlorophyll a fluorescence and an increase in intracellular ROS levels were detected in atrazine exposed cells with respect to control cells. A reduction in cellular pigment contents was also observed in exposed cultures. Transcriptomic analyses advance the understanding of photosynthetic adjustments that occur during herbicide exposure. Inhibition of photosynthesis induced by atrazine toxicity will affect the entire physiological and biochemical states of microalgal cells. Protein profile was also altered by the atrazine stress. Taking into account these results, the increase in some pollutants in aquatic systems could lead to a dramatic decrease in CO_2 fixation at a global level.

Acknowledgements

This work was carried out with the financial support of the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (CGL2010-15993/BOS). M.E. and M.S. acknowledge their pre-doctoral fellowship from the Xunta de Galicia (Spain).

References

- Adamska, I., 1997. ELIPs-light-induced stress proteins. *Physiol. Plant.* 100, 794–805.
- Adamska, I., 2001. The Elip family of stress proteins in the thylakoid membranes of pro- and eukaryota. In: Aro, E.M., Andersson, B. (Eds.), *Advances in Photosynthesis and Respiration-Regulation of Photosynthesis* vol. 11. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 487–505.
- Aluru, M.R., Rodermel, S.R., 2004. Control of chloroplast redox by the IMMUTANS terminal oxidase. *Physiol. Plant.* 120, 4–11.
- Badger, M.R., Price, G.D., 2003. CO_2 concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J. Exp. Bot.* 54, 609–622.
- Bi, F., Grant, A., Reid, B., 2007. Chlorophyll a fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1520–1531.
- Bonente, G., Ballottari, M., Truong, T.B., Morosinotto, T., Ahn, T.K., Fleming, G.R., Niyogi, K.K., Bassi, R., 2011. Analysis of LhcSR3, a protein essential for feedback de-excitation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS Biol.* 9, e1000577.
- Brack, W., Frank, H., 1998. Chlorophyll a fluorescence: a tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40, 34–41.
- 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.
- Carol, P., Kuntz, M., 2001. A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends Plant Sci.* 6, 31–36.

- Chalifour, A., Spear, P.A., Boily, M.H., DeBlois, C., Giroux, I., Dassyva, N., Juneau, P., 2009. Assessment of toxic effects of pesticide extracts on different green algal species by using chlorophyll *a* fluorescence. *Toxicol. Environ. Chem.* 91, 1315–1329.
- Chekounova, E., Voronetskaya, V., Papenbrock, J., Grimm, B., Beck, C.F., 2001. Characterization of *Chlamydomonas* mutants defective in the H subunit of Mg-chelatase. *Mol. Gen. Genomics.* 266, 363–373.
- Choi, C.J., Berges, J.A., Young, E.B., 2012. Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll *a* fluorescence: variable responses among freshwater microalgae. *Water Res.* 46, 2615–2626.
- Chou, T.C., Martin, N., 2005. CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantification of Synergism and Antagonism in Drug Combinations and the Determination of IC50 and ED50 and LD50 Values. CompuSyn, Inc., Paramus, NJ.
- Cid, Á., Herrero, C., Torres, E., Abalde, J., 1995. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquat. Toxicol.* 31, 165–174.
- Couderchet, M., Vernet, G., 2003. Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 271–277.
- Damerval, C., DeVienne, D., Zivy, M., Thiellement, H., 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins. *Electrophoresis* 7, 52–54.
- Didur, O., Perreault, F., Ouakroum, A., Dewez, D., Popovic, R., 2012. Alteration of photosystem II activity by atrazine on *Chlamydomonas reinhardtii* synchronized and asynchronized cell cycle cultures. *Toxicol. Environ. Chem.* 94, 906–917.
- Dowling, V.A., Sheehan, D., 2006. Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology. *Proteomics* 6, 5597–5604.
- Duanmu, D., Miller, A.R., Horken, K.M., Weeks, D.P., Spalding, M.H., 2009. Knockdown of limiting-CO₂-induced gene HLA3 decreases HCO₃⁻ transport and photosynthetic C_i affinity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5990–5995.
- Duanmu, D., Casero, D., Dent, R.M., Gallaher, S., Yang, W., Rockwell, N.C., Lagarias, J.C., 2013. Retrograde bilin signaling enables *Chlamydomonas* greening and phototrophic survival. *PNAS* 110, 3621–3626.
- Ekelund, N.G.A., Aronson, K.A., 2007. Changes in chlorophyll *a* fluorescence in *Euglena gracilis* and *Chlamydomonas reinhardtii* after exposure to wood-ash. *Environ. Exp. Bot.* 59, 92–98.
- Ekmeçi, Y., Terzioğlu, S., 2005. Effects of oxidative stress induced by paraquat on wild and cultivated wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.* 83, 69–71.
- Eriksson, M., Gardestrom, P., Samuelsson, G., 1995. Isolation, purification, and characterization of mitochondria from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 107, 479–483.
- Eriksson, M., Karlsson, J., Ramazanov, Z., Gardestrom, P., Samuelsson, G., 1996. Discovery of an algal mitochondrial carbonic anhydrase: molecular cloning and characterization of a low-CO₂-induced polypeptide in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 12031–12034.
- Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2015. *Chlamydomonas reinhardtii* cells adjust the metabolism to maintain viability in response to atrazine stress. *Aquat. Toxicol.* 165, 64–72.
- European Council, 2013. Directive 2013/39/EC of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 Amending Directives 200/30/EC and 2008/105/EC as Regards Priority Substances in the Field of Water Policy.
- Fernández-Puente, C., Méteos, J., Fernández-Costa, C., Oreiro, N., Fernández-López, C., Ruiz-Romero, C., Blanco, F.J., 2011. Identification of a panel of novel serum osteoarthritis biomarkers. *J. Proteomics* 10, 5095–5101.
- Förster, B., Mathesius, U., Pogson, B.J., 2006. Comparative proteomics of high light stress in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proteomics* 6, 4309–4320.
- Franklin, N.M., Adams, M.S., Stauber, J.L., Lim, R.P., 2001. Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 469–480.
- Gayoso, C.M., Mateos, J., Méndez, J.A., Fernández-Puente, P., Rumbo, C., Tomás, M., Martínez de Iarduya, O., Bou, G., 2014. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J. Proteome Res.* 13, 276–286.
- Geoffroy, L., Giblin, R., Simon, O., Floriani, M., Adam, C., Pradines, C., Courmac, L., Garnier-Laplace, J., 2007. Effect of selenate on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 83, 149–158.
- Giordano, M., Norici, A., Forssen, M., Eriksson, M., Raven, J.A., 2003. An anaplerotic role for mitochondrial carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 132, 2126–2134.
- González-Barreiro, O., Rioboo, C., Cid, Á., Herrero, C., 2004. Atrazine-induced chlorosis in *Synechococcus elongatus* cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 301–307.
- Harris, E.H., 1989. The *Chlamydomonas* Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. Academic Press, San Diego.
- Havaux, M., 2003. Spontaneous and thermoinduced photon emission: new methods to detect and quantify oxidative stress in plants. *Trends Plant Sci.* 8, 409–413.
- Hayes, T.B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., Adame, L., Chan, E., Buchholz, D., Stueve, T., Gallipeau, S., 2010. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *PNAS* 107, 4612–4617.
- Hemschmeier, A., Casero, D., Liu, B., Benning, C., Pellegrini, M., Happe, T., Merchant, S.S., 2013. Copper response regulator1-dependent and -independent responses of the *Chlamydomonas reinhardtii* transcriptome to dark anoxia. *Plant Cell* 25, 3186–3211.
- Houille-Vernes, L., Rappaport, F., Wollman, F., Alric, J., Johnson, X., 2011. Plastid terminal oxidase 2 (PTOX2) is the major oxidase involved in chlororespiration in *Chlamydomonas*. *PNAS* 108, 20820–20825.
- Huang, S., Hainzl, T., Grundström, C., Forsman, C., Samuelsson, G., Sauer-Eriksson, A.E., 2011. Structural studies of β-carbonic anhydrase from the green alga *Coccomyxa*: inhibitor complexes with anions and acetazolamide. *PLoS ONE* 6, e28458.
- Hutin, C., Nussaume, L., Moise, N., Moya, I., Kloppstech, K., Havaux, M., 2003. Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4921–4926.
- Iwai, M., Kato, N., Minagawa, J., 2007. Distinct physiological responses to a high light and low CO₂ environment revealed by fluorescence quenching in photoautotrophically grown *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.* 94, 307–314.
- Jamers, A., De Coen, W., 2010. Effect assessment of the herbicide paraquat on a green alga using differential gene expression and biochemical biomarkers. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 893–901.
- Jamers, A., Blust, R., De Coen, W., 2009. Omics in algae: paving the way for a systems biological understanding of algal stress phenomena? *Aquat. Toxicol.* 92, 114–121.
- Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F., 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*1 and *c*2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Plantz.* 167, 191–194.
- Johnson, X., Alric, J., 2013. Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. *Eukaryot. Cell* 12, 776–793.
- Juneau, P., El Berdey, A., Popovic, R., 2002. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 155–164.
- Jungnick, N., Ma, Y., Mukherjee, B., Cronan, J.C., Speed, D.J., Laborde, S.M., Longstreth, D.J., Moroney, J.V., 2014. The carbon concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*: finding the missing pieces. *Photosynth. Res.* 121, 159–173.
- Król, M., Ivanov, A.G., Jansson, S., Kloppstech, K., Huner, N.P.A., 1999. Greening under high light or cold temperature affects level of xanthophyll cycle pigments, early light-inducible proteins, and light-harvesting polypeptides in wild-type barley and the *chlora12* mutant. *Plant Physiol.* 120, 193–203.
- Lackner, D., Schmidt, M., Wu, S., Wolf, D., Bähler, J., 2012. Regulation of transcriptome, translation, and proteome in response to environmental stress in fission yeast. *Genome Biol.* 13, 1–14.
- Laloi, C., Apel, K., Danon, A., 2004. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 323–328.
- Lers, A., Levy, H., Zamir, A., 1991. Co-regulation of a gene homologous to early light-induced genes in higher plants and β-carotene biosyn-thesis in the alga *Dunaliella bardawil*. *J. Biol. Chem.* 266, 13698–13705.
- Levy, H., Tal, T., Shaish, A., Zamir, A., 1993. Cbr, an algal homolog of plant early light-induced proteins, is a putative zeaxanthin-binding protein. *J. Biol. Chem.* 268, 20892–20896.
- 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.
- Lopez, D., Casero, D., Cokus, S.J., Merchant, S.S., Pellegrini, M., 2011. Algal functional annotation tool: a web-based analysis suite to functionally interpret large gene lists using integrated annotation and expression data. *BMC Bioinform.* 12, 282.
- Ma, J., Wang, S., Wang, P., Ma, L., Chen, X., Xu, R., 2006. Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 456–462.
- Marchetti, G., Minella, M., Maurino, V., Minerio, C., Vione, D., 2013. Photochemical transformation of atrazine and formation of photointermediates under conditions relevant to sunlit surface waters: laboratory measures and modeling. *Water Res.* 47, 6211–6222.
- Martinez, R.S., Di Marzio, W.D., Sáenz, M.E., 2014. Genotoxic effects of commercial formulations of Chlorpyrifos and Tebuconazole on green algae. *Ecotoxicology* 24, 45–54.
- Maryama, S., Tokutsu, R., Minagawa, J., 2014. Transcriptional regulation of the stress-responsive light harvesting complex genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 55, 1304–1310.
- McKay, R.M.L., Gibbs, S.P., Vaughn, K.C., 1991. RuBisCo activase is present in the pyrenoid of green algae. *Protoplasma* 162, 38–45.
- Melegari, S.P., Perreault, F., Costa, R.H.R., Popovic, R., Matias, W.G., 2013. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 142–143, 431–440.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, J., Wilman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Marechal-Drouard, L., et al., 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318, 245–250.
- Miura, K., Yamano, T., Yoshioka, S., Kohinata, T., Inoue, Y., Taniguchi, F., Asamizu, E., Nakamura, Y., Tabata, S., Yamato, K.T., Ohyama, K., Fukuzawa, H., 2004. Expression profiling-based identification of CO₂-responsive genes regulated by CCM1 controlling a carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 135, 1595–1607.
- Mofeed, J., Mosleh, Y.Y., 2013. Toxic responses and antioxidative enzymes activity of *Scenedesmus obliquus* exposed to fenhexamid and atrazine, alone and in mixture. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 95, 234–240.
- Monsinjon, T., Knigge, T., 2007. Proteomic applications in ecotoxicology. *Proteomics* 7, 2997–3009.
- Montané, M.H., Kloppstech, K., 2000. The family of light-harvesting-related proteins (LHCs, ELIPs, HLIPs): was the harvesting of light their primary function? *Gene* 258, 1–8.
- Moroney, J.V., Alvarez, R.A., 2007. Proposed carbon dioxide concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 6, 1251–1259.
- Moroney, J.V., Ma, Y., Frey, W.D., Fusilier, K.A., Pham, T.T., Simms, T.A., DiMario, R.J., Yang, J., Mukherjee, B., 2011. The carbonic anhydrase isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: intracellular location, expression, and physiological roles. *Photosynth. Res.* 109, 133–149.
- Nestler, H., Groh, K.J., Schönenberger, R., Eggen, R.L.L., Suter, M.J.F., 2012. Linking proteome responses with physiological and biochemical effects in herbicide-exposed *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Proteome* 75, 5370–5385.

- Peltier, G., Coumac, L., 2002. Chlororespiration. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 523–550.
- Perreault, F., Ouakroum, A., Melegari, S.P., Mattias, W.G., Popovic, R., 2012. Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere* 87, 1388–1394.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2011. Characterization of cell response in *Chlamydomonas moewusii* cultures exposed to the herbicide paraquat: induction of chlorosis. *Aquat. Toxicol.* 102, 10–17.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Suarez-Bregua, P., Cid, A., 2012a. Flow cytometric analysis to evaluate physiological alterations in herbicide-exposed *Chlamydomonas moewusii* cells. *Ecotoxicology* 21, 409–420.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2012b. Screening acute cytotoxicity biomarkers using a microalga as test organism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 86, 219–226.
- Qian, H., Chen, W., Li, J., Wang, J., Zhou, Z., Liu, W., Fu, Z., 2009. The effect of exogenous nitric oxide on alleviating herbicide damage in *Chlorella vulgaris*. *Aquat. Toxicol.* 92, 250–257.
- Ramagli, L.S., Rodriguez, L.V., 1985. Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* 6, 559–563.
- Raven, J.A., 2001. A role for mitochondrial carbonic anhydrase in limiting CO₂ leakage from low CO₂-grown cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Environ.* 24, 261–265.
- Richard, C., Ouellet, H., Guertin, M., 2000. Characterization of the L1818 polypeptide from the green unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* 42, 303–316.
- Rioboo, C., Prado, R., Herrero, C., Cid, A., 2007. Population growth study of the rotifer *Brachionus* sp. fed with triazine-exposed microalgae. *Aquat. Toxicol.* 83, 247–253.
- Rosenwasser, S., Graff van Crevel, S., Schatz, D., Malitsky, S., Tzfadia, O., Aharoni, A., Levi, Y., Gabashvili, A., Feldmesser, E., Vardi, A., 2014. Mapping the diatom redox-sensitive proteome provides insight into response to nitrogen stress in the marine environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2740–2745.
- Rutherford, A.W., Krieger-Liszka, A., 2001. Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends Biochem. Sci.* 6, 648–653.
- Sjollema, S.B., Martínezgarcía, G., van der Geest, H.G., Kraak, M.H.S., Booij, P., Vethaak, A.D., Admiraal, W., 2014. Hazard and risk of herbicides for marine microalgae. *Environ. Pollut.* 187, 106–111.
- Spalding, M.H., 2008. Microalgal carbon-dioxide-concentrating mechanisms: *Chlamydomonas* inorganic carbon transporters. *J. Exp. Bot.* 59, 1463–1473.
- Staub, E.J., Fink, A., Markert, C., Kruse, O., Johanningmeier, U., Hippler, M., 2003. Proteomics of *Chlamydomonas reinhardtii* light-harvesting proteins. *Eukaryot. Cell* 2, 978–994.
- Strickland, J.D., Parsons, T.R., 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Board Can.* 167, 201–203.
- Subramanian, V., Dubini, A., Astling, D.P., Laurens, L.M.L., Old, W.M., Grossman, A.R., Seibert, M., 2014. Profiling *Chlamydomonas* metabolism under dark, anoxic H₂-producing conditions using a combined proteomic, transcriptomic, and metabolomic approach. *J. Proteome Res.* 13, 5431–5451.
- Tirumani, S., Kokkanti, M., Chaudhari, V., Shukla, M., Rao, B.J., 2014. Regulation of CCM genes in *Chlamydomonas reinhardtii* during conditions of light–dark cycles in synchronous cultures. *Plant Mol. Biol.* 85, 277–286.
- Tzvetkova-Chevolleau, T., Franck, F., Alawady, A.E., Dall’Osto, L., Carriere, F., Bassi, R., Grimm, B., Nussaume, L., Havaux, M., 2007. The light stress-induced protein ELIP2 is a regulator of chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 50, 795–809.
- Weiner, A.J., Delorenzo, M.E., Fulton, M.H., 2004. Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. *Aquat. Toxicol.* 68, 121–128.
- Winck, F.V., Pérez Melo, D.O., González Barrios, A.F., 2013. Carbon acquisition and accumulation in microalgae *Chlamydomonas*: insights from “omics” approaches. *J. Proteome Res.* 12, 207–218.
- Zhang, X., Cao, S., Li, Y., Mou, S., Xu, D., Fan, X., Ye, N., 2012. Expression of three putative early light-induced genes under different stress conditions in the green alga *Ulva linza*. *Plant Mol. Biol. Report.* 30, 940–948.

4.2. Capítulo II: “*Chlamydomonas reinhardtii* cells adjust the metabolism to maintain viability in response to atrazine stress”

La actividad antropológica es una continua amenaza para la estabilidad de los ecosistemas, en particular los ecosistemas acuáticos reciben una gran cantidad de contaminantes que afectan a los procesos biológicos y fisiológicos de los organismos que los habitan. Debido al uso extendido de herbicidas en la agricultura, su presencia en las aguas naturales es cada vez más importante. Estos pesticidas, como la atrazina, junto a otros contaminantes, alcanzan los sistemas acuáticos naturales a través de las aguas de escorrentía, y una vez allí pueden ejercer su actividad tóxica sobre especies de plantas o de microorganismos fototróficos para los que no se habían diseñado. Los microorganismos fototróficos, como la microalga *C. reinhardtii*, se encuentran en la base de la cadena trófica de los sistemas acuáticos, y cualquier agente externo que los perturbe puede ocasionar un desequilibrio mayor en los niveles superiores de la cadena, provocando modificaciones funcionales y estructurales permanentes en los ecosistemas. Resulta, por tanto, evidente la necesidad de estudios encaminados a diagnosticar, evaluar y caracterizar la respuesta celular de las microalgas ante situaciones de estrés provocadas por la presencia de concentraciones subletales de herbicidas en el medio.

El objetivo del presente trabajo ha sido el estudio de la respuesta de la microalga de agua dulce *C. reinhardtii* expuesta a una concentración subletal del herbicida atrazina (0,25 μM , la EC_{50} para el crecimiento a las 96 h) durante 24 h. Diferentes parámetros relacionados con el estatus energético celular, como la actividad celular y los potenciales de membrana citoplasmática y mitocondrial, fueron monitorizados mediante citometría de flujo (FCM) como potenciales marcadores de citotoxicidad. También se analizaron cambios en el transcriptoma celular mediante la técnica de RNA-Seq entre las células control y las células expuestas a atrazina durante 3 y 24 h.

Mediante FCM se llevaron a cabo estudios de crecimiento con *Flow Count Fluorospheres* y se expresaron los resultados como tasas de crecimiento (μ), se determinó la viabilidad celular utilizando el fluorocromo yoduro de propidio (PI), se estudió la actividad metabólica celular mediante un ensayo en tiempo real usando el fluorocromo diacetato de fluoresceína (FDA), se analizó el potencial de membrana citoplasmática con el fluorocromo DiBAC₄(3), por último también se estudió el potencial de membrana mitocondrial con el fluorocromo JC-1. Finalmente se realizaron estudios transcriptómicos y, para ello se llevaron a cabo extracciones de RNA a las 3 y 24 h de exposición al herbicida para construir una librería de DNAc y realizar una secuenciación, RNA-Seq, para conocer los genes que están

expresados diferencialmente en los cultivos expuestos a atrazina con respecto al control en los dos tiempos analizados.

Mediante FCM se observó que para ambos tiempos ensayados la atrazina provoca un descenso significativo de la actividad metabólica celular, un aumento significativo del porcentaje de células con la membrana citoplasmática despolarizada y una hiperpolarización significativa de las membranas mitocondriales. También se observó un descenso significativo del crecimiento tras 24 h de exposición al herbicida; sin embargo no se observaron cambios en la viabilidad de los cultivos expuestos en ninguna de las horas ensayadas.

Los datos de RNA-Seq mostraron 12 genes expresados diferencialmente con respecto al control en los cultivos expuestos durante 3 y 24 h a atrazina y sólo 1 de estos genes aparece subexpresado. En relación a la categoría de aminoácidos, 4 transcritos relacionados con el catabolismo de aminoácidos (*MCCA*, *AAH1*, *GDH2* y *CLR21*) están sobreexpresados. En la categoría de energía 4 transcritos (*ICL1*, *PCK1B*, *ETFA* y *ETFB*) están también sobreexpresados. Estos datos transcriptómicos se relacionan con los resultados obtenidos por FCM donde se observaron perturbaciones en la membrana plasmática y mitocondrial y alteraciones en la actividad metabólica. Además se observó una sobreexpresión significativa en la categoría de expresión génica (*FKB16-1*), en la categoría de estrés y especies reactivas de oxígeno (*GOX9*) y en la categoría de metabolismo (*RHP-2*). Solamente un transcrito perteneciente a la categoría de Redox (*NIT1*) aparece subexpresado en este estudio.

La concentración subletal de atrazina empleada en este estudio altera el estatus energético de las células de *C. reinhardtii*. Empleando protocolos de FCM se observó un descenso de la actividad celular, una despolarización de la membrana plasmática y una hiperpolarización de la membrana mitocondrial en todos los cultivos expuestos durante 3 y 24 h al herbicida con respecto a los cultivos control. El análisis por RNA-Seq también mostró una alteración energética, los datos transcriptómicos revelaron una mayor abundancia de los transcritos relacionados con la generación de energía heterotrófica y la disposición de electrones en las células estresadas. Los cambios más significativos se observaron en los genes implicados en el catabolismo de aminoácidos y en los procesos de respiración celular. Los resultados obtenidos sugieren una inhibición de la fotosíntesis provocada por el mecanismo de acción del herbicida. Debido a esto las células tendrían que obtener energía a través del metabolismo heterotrófico para mantener su viabilidad. A pesar de estas alteraciones, las células son capaces de sobreponerse al estrés, lo que indica que *C. reinhardtii* presenta una gran adaptabilidad a las condiciones adversas.



Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquatox

Chlamydomonas reinhardtii cells adjust the metabolism to maintain viability in response to atrazine stress



Marta Esperanza, Marta Seoane, Carmen Rioboo, Concepción Herrero, Ángeles Cid*

Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña, Campus de A Zapateira s/n, 15071 A Coruña, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 March 2015

Received in revised form 11 May 2015

Accepted 15 May 2015

Available online 19 May 2015

Keywords:

Microalga

Atrazine

Cytotoxicity

RNA-Seq

Flow cytometry

ABSTRACT

Chlamydomonas reinhardtii cells were exposed to a sublethal concentration of the widespread herbicide atrazine for 3 and 24 h. Physiological parameters related to cellular energy status, such as cellular activity and mitochondrial and cytoplasmic membrane potentials, monitored by flow cytometry, were altered in microalgal cells exposed to 0.25 μM of atrazine. Transcriptomic analyses, carried out by RNA-Seq technique, displayed 12 differentially expressed genes between control cultures and atrazine-exposed cultures at both tested times. Many cellular processes were affected, but the most significant changes were observed in genes implicated in amino acid catabolism and respiratory cellular process. Obtained results suggest that photosynthesis inhibition by atrazine leads cells to get energy through a heterotrophic metabolism to maintain their viability.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Anthropogenic activity is a constant menace to the stability of ecosystems and the ecological risk assessment of organic pollutants, including herbicides, has become a priority field in current ecotoxicological research. In this sense, aquatic systems are recipients of many chemicals with potential deleterious effects on various physiological and biological processes of their biota. A considerable amount of the herbicides applied in crop fields enters into freshwater aquatic ecosystems through surface runoff or leaching, leading to environmental contamination (Törnqvist et al., 2011). These pollutants exert their toxicity on different types of organisms that were not the original target, such as unicellular algae, the primary producers in the aquatic food web. Adverse herbicide effects on microalgae could also alter higher trophic levels, potentially compromising biodiversity, structure and function of freshwater ecosystems (Campanella et al., 2001; Rioboo et al., 2007).

One of the herbicides most extensively applied in agriculture all over the world is atrazine. It was found in many surface and ground waters and listed as priority substance under the European Water Framework Directive as described in Directive 2013/39/EU. Atrazine inhibits photosynthesis blocking the photosynthetic electron transport at photosystem II (Rutherford and Krieger-Liszskay, 2001) and thereby energy production, preventing CO_2 fixation in target and non-target organisms. Its widespread application, persistence, and mobility have led to its frequent detection in ground and surface water sources (Hayes et al., 2010) at concentrations exceeding $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (USEPA, 2012). Atrazine-induced detrimental effects on the aquatic ecosystem and alterations in aquatic community structure have been reported previously (Choi et al., 2012; Didur et al., 2012; Sjollem et al., 2014; Weiner et al., 2004). This herbicide has also been reported to affect the human endocrine, central nervous, immune, and reproductive systems (Liu et al., 2014).

Microalgae have been proposed as an alternative to traditional analyses for ecotoxicological laboratory studies due to their short generation times and rapid responses to environmental changes. These organisms are extremely useful as tools to assess the toxicity of contaminants in water (Ma et al., 2006), using standardized tests (e.g., according to ISO (2012) and OECD (2011) guidelines) which focus on growth inhibition of these unicellular algae. Currently, with the development of the omics, new alternatives arise to study the effects of pollutants on microalgae (Jamers et al., 2009). In particular, transcriptomic analysis has a great potential to investigate subcellular mechanisms of stress and responses affecting growth

Abbreviations: a.u., arbitrary units; DiBAC₄(3), lipophilic anionic oxonol dye bis-(1,3-dibu-tylbarbituric acid) trimethine oxonol; FCM, flow cytometry; FDA, fluorescein diacetate; FDR, false discovery rate; FS, forward scatter light; JC-1, 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide; LFC, log₂ fold change; PI, propidium iodide; PS, photosystem; ROS, reactive oxygen species; RPM, reads per million mapped reads; SS, side scatter light; TCA, tricarboxylic acid cycle.

* Corresponding author. Tel.: +34 981 167 000.

E-mail address: angeles.cid@udc.es (Á. Cid).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.05.012>
0166-445X/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

and cellular physiology and biochemistry. Among aquatic microalgae, the freshwater species *Chlamydomonas reinhardtii* is currently used extensively in biological research and in molecular genetic studies as a biological model because of its ease of cultivation, rapid growth, possibility of inducing sexual reproduction and because it is haploid (Harris, 1989, 2001), and its genome has been sequenced (Merchant et al., 2007).

The aim of the present work has been the study of the response of the freshwater microalga *C. reinhardtii* exposed to a sublethal concentration of the herbicide atrazine for 24 h, focused on the possible alteration of the cellular activity, as well as the mitochondrial and cytoplasmic membrane potentials. These parameters, related to cellular energy status, were monitored by flow cytometry (FCM) as potential good markers of cytotoxicity, since this technique allows the rapid analysis of a high number of cell functions under near *in vivo* conditions. Changes in the cellular transcriptome between control cells and cells exposed to atrazine for 3 and 24 h, were also determined using the RNA-Seq technique.

2. Materials and methods

2.1. Microalgal cultures

The unicellular green alga *C. reinhardtii* Dangeard (strain CCAP 11/32A mt+) was obtained from the Culture Collection of Algae and Protozoa of Dunstaffnage Marine Laboratory (Scotland, UK). *C. reinhardtii* cells were cultured in Tris-minimal phosphate medium (Harris, 1989) on a rotary shaker set at 150 rpm, under controlled conditions: 22 ± 1 °C and illuminated with $100 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ under a 12:12 h light:dark cycle. Cells in mid-logarithmic growth phase were used as inoculum for the different assays. Initial cell density for each experiment was 2×10^5 cells mL^{-1} .

Atrazine concentration used ($0.25 \mu\text{M}$) in the present study was based on 96 h EC_{50} determined by previous toxicity test (data not shown). Before each experiment, fresh stock solutions of atrazine were prepared by dissolving the pure compound (Sigma-Aldrich, MW: 215.68) in methanol and filtering through $0.2 \mu\text{m}$ membrane filters. No significant differences between nominal and effective concentration of atrazine were found using a gas chromatography/mass spectrometry analysis.

All cultures were carried out in duplicate and the different analyses were done after 3 and 24 h of culture. These time points were selected based on previous cytometry studies where the effects of atrazine were analyzed every hour during 24 h; after 3 h of atrazine exposure changes in the cellular metabolic activity were detected, whereas after 24 h a light:dark cycle was completed.

2.2. Flow cytometric analyses

FCM analyses of *C. reinhardtii* cells were performed on a Beckman-Coulter Gallios flow cytometer fitted with 488 nm and 633 nm excitation lasers, detectors of forward (FS) and side (SS) light scatter and four fluorescence detectors corresponding to different wavelength intervals: 505–550 nm (FL1), 550–600 nm (FL2), 600–645 nm (FL3) and >645 nm (FL4). The 488 nm argon-ion laser was used as excitation source for all the probes assayed. Forward scatter (FS, an estimation of cell size) and red autofluorescence (FL4 channel, an estimation of cell chlorophyll-*a* content) dot-plots were used to characterize the microalgal population, setting gating levels in order to exclude non-microalgal particles. At least 10,000 gated cells per sample were collected and analyzed using Kaluza software version 1.1 (Beckman Coulter).

Cell suspensions (2×10^5 cells mL^{-1}) were incubated with the appropriate fluorochrome at room temperature and in darkness. The lowest fluorochrome concentration and the shortest incubation

time were chosen in order to obtain significant and stable staining of cells without toxicity being developed. All FCM determinations were performed at least twice and duplicate samples were run on the flow cytometer.

2.2.1. Growth measurement

Growth of microalgal cultures was measured by counting culture aliquots in the flow cytometer using a suspension of fluorochrome-containing micro-spheres for its calibration (Flow Count Fluorospheres, Beckman Coulter Inc.).

Growth rates (μ) expressed as day^{-1} were calculated via the formula $\mu = [\ln(N_t) - \ln(N_0)] / \ln 2(t - t_0)$ where N_t is the cell density at time t and N_0 is the cell density at time t_0 .

2.2.2. Cell viability determination

Propidium iodide (PI) was used to discriminate between viable non-fluorescent cells and non-viable fluorescent cells with cell membrane damage. *C. reinhardtii* cells were incubated with $4 \mu\text{M}$ of PI for 15 min prior samples were analyzed by FCM (Prado et al., 2009a). The orange fluorescent emission of PI was collected in the FL3 channel indicated above. Results were expressed as the percentage of viable cells vs. the total amount of cells analysed by FCM.

2.2.3. Cellular metabolic activity determination: kinetic assay

Cellular activity level was evaluated using a kinetic approach to the fluorescein diacetate (FDA)-based cell esterase activity assay (Prado et al., 2012a). Cell suspensions were stained with $0.24 \mu\text{M}$ FDA. FDA-dependent fluorescence generation rates (indicative of the metabolic activity level, and expressed as arbitrary relative fluorescence units per min, a.u.), were calculated by regression analysis of mean values of green-fluorescence intensity (normalized to cell size values estimated using FS) over time.

2.2.4. Cytoplasmic membrane potential assessment

This parameter was monitored using a slow-response potentiometric probe with the lipophilic anionic oxonol dye bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (DiBAC₄(3)) as previously described in Prado et al. (2012a). *C. reinhardtii* cell suspensions were stained with $0.97 \mu\text{M}$ DiBAC₄(3) for 10 min. DiBAC₄(3) green fluorescent emission was collected in the FL1 channel indicated above. Results were expressed as the percentage of depolarized cells vs. the total amount of cells analysed per culture.

2.2.5. Mitochondrial membrane potential measurement

Changes in mitochondrial membrane potential of *C. reinhardtii* cells after treatment with atrazine were evaluated by staining cells with the lipophilic cationic probe JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide) (Prado et al., 2012b). *C. reinhardtii* cells were incubated with $3 \mu\text{M}$ of JC-1 for 20 min. Mitochondrial membrane potential results were expressed as the mean orange (JC-1 oligomers)/green (JC-1 monomers) fluorescence intensity ratio which only depends on the mitochondrial membrane potential measurement (Cassart et al., 2007).

2.3. Total RNA extraction and RNA-Seq

RNA was isolated from control and atrazine exposed ($0.25 \mu\text{M}$) cells after 3 and 24 h of culture, using the reagent NZYol (NZYTech). Frozen samples were homogenized using a mortar and pestle under liquid nitrogen. 1 mL of NZYol was added directly to the homogenate, and transferred to a nuclease-free 1.5 mL tube. Then, 0.2 volumes of chloroform-isoamyl alcohol (24:1) were added, the mixture was centrifuged, and the supernatant was recovered into a new tube. One volume of ice-cold isopropanol was added, and the mixture was kept at -20 °C overnight in order to precipitate

the RNA. The samples were centrifuged, and the supernatant discarded. The pellet was washed with 75% ethanol. The ethanol was discarded, and the pellet resuspended in a final volume of 30 μL (Chomczynski and Sacchi, 2006).

After that, a DNase treatment was carried out with 2.5 μL of RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer (Promega), 2 units of RQ1 RNase-Free DNase (Promega), and 21.5 μL of the RNA solution. RNA concentration and integrity were measured in an Agilent 2100 bioanalyzer.

Then a cDNA library construction and Illumina HiSeq 2000 sequencing were done with the collaboration of AllGenetics & Biology, SL. A total number of 8 cDNA libraries were constructed, one per sample (2 control and 2 treated samples at 3 h and 2 control and 2 treated samples at 24 h), using the TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 (Illumina), strictly following the manufacturer's instructions and the pool was sequenced in a HiSeq 2000 PE100 lane.

2.4. Data analysis

For the FCM data analysis mean values \pm standard deviation (SD) of at least two experiments were calculated and statistically analysed by an overall one-way analysis of variance (ANOVA) using SPSS Statistic software (version 21.0, SPSS, IBM). A p -value <0.05 was considered statistically significant. When significant differences were observed, controls vs. treated means were compared using the Dunnett test.

For the RNA-Seq data the bioinformatic analysis was carried out by ECSEQ bioinformatics, using the "edgeR 3.8.5" program for the analysis of differential expression of the genes. Only genes with a "false discovery rate" (FDR) ≤ 0.01 and a "log₂ fold change" (LFC) ≥ 1 or ≤ -1 were selected. Then, differentially expressed genes were classified manually by categories of functions previously described in Hemschemeier et al. (2013), using information from Ensembl Plants 22 *C. reinhardtii* v3.1. Furthermore, GO enrichment analyses were performed using the algal functional annotation tool at <http://pathways.mcdb.ucla.edu/algal/index.html> (Lopez et al., 2011).

3. Results and discussion

3.1. Growth and cell viability

Growth inhibition and cell viability were analysed to assess potential toxic effects of atrazine at a population level. Growth rates were calculated after 24 h of culture. Atrazine exposure induced a significant inhibitory effect on *C. reinhardtii* growth in comparison with control cultures ($p < 0.05$). Growth rates (μ) at 24 h were $1.73 \pm 0.20 \text{ day}^{-1}$ for control cultures and $0.94 \pm 0.03 \text{ day}^{-1}$ for cultures exposed to atrazine; therefore, this herbicide caused an inhibition of growth of 45.6%.

To determine whether the significant decrease recorded in the *C. reinhardtii* proliferation was associated with the loss of cell viability, a FCM assay based on dye exclusion of the probe PI was used to identify cells with intact plasma membrane. The percentage of *C. reinhardtii* viable cells, with intact plasma membrane (PI-cells), after 3 and 24 h of atrazine exposure remained close to 95% for both control cultures and atrazine exposed cultures ($p > 0.05$) (Fig. 1).

The toxicity of atrazine on *C. reinhardtii* growth has been reported previously (Fischer et al., 2010; Reboud et al., 2007). In the present study, although a significant decrease in the growth rate was observed, cell viability was not affected at the tested concentration; this means that 0.25 μM of atrazine is a sublethal concentration (Fig. 1). It has been also reported that microalgal cells exposed to atrazine were not able to complete their cell division but maintained their metabolic activity and cell viability

(González-Barreiro et al., 2004a,b). The potential stimulation of the antioxidant defense mechanisms (Chankova et al., 2014; Dewez et al., 2005) could be involved in this maintenance. Obtained results indicate that cytoplasmic membrane integrity was affected only after other cellular parameters had already been damaged in a strong way by the herbicide.

3.2. Cellular metabolic activity

To further characterize the potential cytotoxic effect of atrazine on metabolic activity of *C. reinhardtii* cells, a kinetic approach to the FDA-based cell esterase activity assay was used taking into account only metabolically active cells. *In fluxo* analysis of cellular non-specific esterase activity revealed that atrazine exposure induced a significant ($p < 0.05$) reduction in metabolic activity of *C. reinhardtii* cells with respect to control cultures. Cell activity decreased 31% and 29% at 3 and 24 h, respectively, in cultures exposed to 0.25 μM of the herbicide (Fig. 2). Non-significant changes in the percentage of viable cells were observed (Fig. 1), whereas cell activity in viable cells was affected at tested times (Fig. 2). These results could potentially be explained by growth data at 24 h, since a reduction about 50% of the growth was observed in the cultures exposed to atrazine with respect to control cultures. Our results confirm previous findings regarding a decline in esterase activity in *Chlamydomonas* cells exposed to different herbicides (Jagers and De Coen, 2010; Nestler et al., 2012; Prado et al., 2009a) and other aquatic pollutants (Prado et al., 2015). Obtained results could indicate that the mechanism of action of atrazine generates oxidative stress that causes redox misbalances and alterations in protein synthesis and, therefore, a general decrease in cellular activity. A good correlation between the rate of conversion of FDA to fluorescein (esterase activity) and photosynthetic activity has also been described in unicellular algae (Brookes et al., 2000). Taking into account this correlation, the inhibition of the esterase activity could be due to the oxidative damage provoked by atrazine at photosystem II level in microalgal cells.

3.3. Cytoplasmic and mitochondrial membrane potentials

FCM analysis of DiBAC₄(3)-stained cells showed that atrazine affected cytoplasmic membrane potential of *C. reinhardtii* cells, leading to the depolarization of the plasma membrane, i.e., to a huge fluorochrome influx to the cells. A significant increase in the percentage of cells with a depolarized cytoplasmic membrane was observed in cultures exposed to the herbicide with respect to control cultures at both tested times. Cultures exposed to the sublethal atrazine concentration showed an increase in depolarized cells of 33% and 31% at 3 and 24 h, respectively (Fig. 3A).

C. reinhardtii cells were also stained with the mitochondria-specific dye, JC-1, widely used to monitor mitochondrial membrane potential. Atrazine exposure caused a change of mitochondrial membrane potential at tested times, as evidenced by the significantly higher orange (JC-1 oligomers)/green (JC-1 monomers) fluorescence ratio values recorded in atrazine-treated cells relative to those in non-treated controls ($p < 0.05$). After 3 h and 24 h of exposure, values of mitochondrial membrane potential in treated cells increased 2.18- and 1.36-fold, respectively (Fig. 3B).

These results together viability data indicate that the induced damage in the plasma membrane begins with changes in the permeability properties (depolarization) before the disruption of the membrane integrity (Prado et al., 2012b, 2015). Previous studies in different microorganisms have also reported this change in the permeability of the cytoplasmic membrane (Bouix and Ghorbal, 2015; Lloyd et al., 2004; Wickens et al., 2000). Any alteration in the cytoplasmic membrane potential can be considered a fast and sensitive indicator of the presence of stress factors that can lead to important physiological changes for the proper functioning of

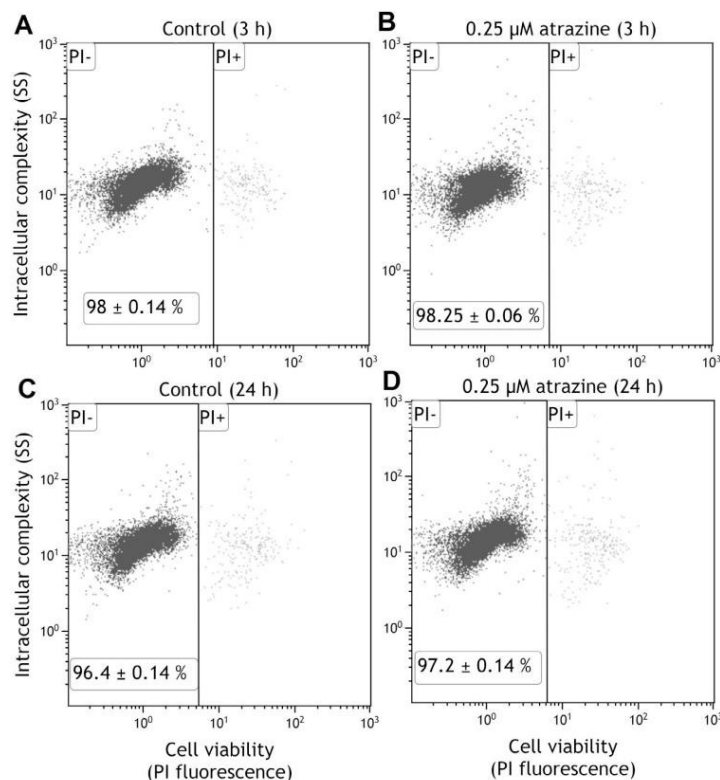


Fig. 1. Cell viability of *C. reinhardtii* in control and atrazine exposed (0.25 μ M) cultures. (A) and (C) control cultures at 3 and 24 h, respectively; (B) and (D) atrazine exposed cultures at 3 and 24 h, respectively. Results are expressed as percentage of viable cells (PI negative) vs. the total amount of cells analyzed by FCM. Values are shown as mean \pm SD of experimental duplicates.

C. reinhardtii cells. The depolarization of the membrane was also related to the inhibition of H^+ -ATPases and Na^+/K^+ -ATPases pumps in membrane, that are considered the main generators of electrochemical gradients in plants (Krol et al., 2003). Due to these changes it is normal that the cellular activity mentioned earlier was affected (Fig. 2).

A significant hyperpolarization of the mitochondrial membrane potential was observed in *C. reinhardtii* cells after 3 and 24 h of atrazine exposure at assayed concentration (Fig. 3B). The mechanism of action of atrazine affects the photosynthesis, but could also provoke perturbations on mitochondrial respiratory chain. Several authors reported that physiologically, mitochondrial hyperpolarization could be due to an increase in respiration, with a higher electron flux, more active oxidative phosphorylation and consequently, possible leaks of electrons that favored the generation of ROS, as a by-product of the ATP-generating process (Huc et al., 2012; Loseva et al., 2004; Wallace, 2005). Atrazine toxicity on mitochondrial respiratory chain has been studied in murine and human cells (Chen et al., 2015; Koo et al., 2012). Furthermore, other studies in animal and vegetal cells have observed a protonophoric effect exerted by herbicides, such as paraquat, on mitochondria, i.e., this herbicide causes a depolarization of the inner mitochondrial membrane and an uncoupling of the oxidative phosphorylation

(Costantini et al., 1995; Palmeira et al., 1995; Prado et al., 2012b; Vicente et al., 2001).

3.4. Transcriptomic analyses

The RNA-Seq data showed 12 differentially expressed genes ($FDR \leq 0.01$ and $LFC \geq 1$ or ≤ -1) between control cultures and cultures exposed to atrazine at both tested times (3 and 24 h). Among these 12 genes, 11 were upregulated and only 1 was downregulated in cultures exposed to the herbicide with respect to non-treated cultures. All these differentially expressed genes were classified according to the biological process wherein they are involved and to their molecular functions in the following categories: amino acids, energy, metabolism, ROS and stress, gene expression and redox (Table 1).

Regarding to the amino acid category, 4 transcripts are related to amino acid catabolism (*MCCA*, *AAH1*, *GDH2* and *CLR21*) and all these genes were significantly ($FDR \leq 0.01$ and $LFC \geq 1$ or ≤ -1) upregulated at both tested times (Table 1). The early accumulation of transcripts coding for amino acid catabolic enzymes or proteins related to amino acid catabolism pathways suggests that *C. reinhardtii* resorts first to amino acid degrading pathways to obtain energy, when the photosynthetic process is affected (Hem-

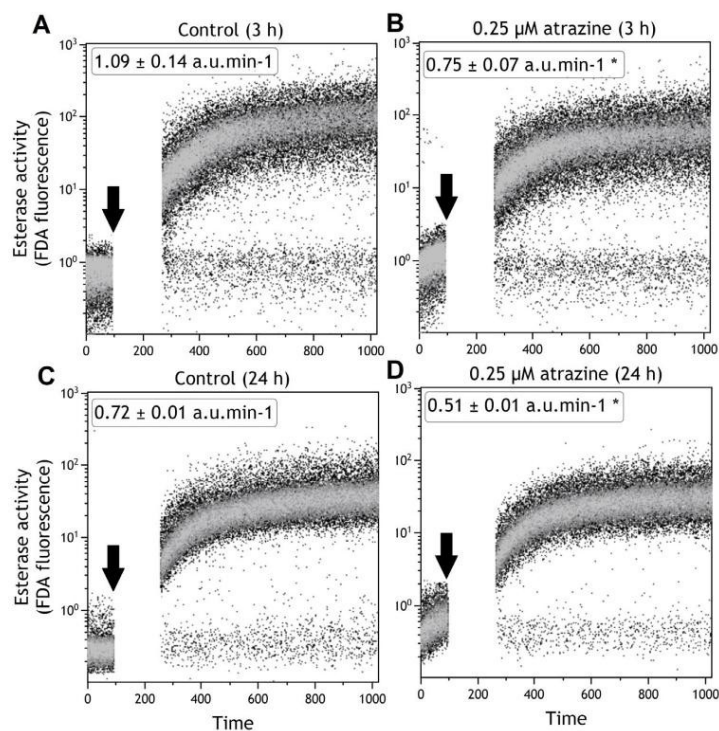


Fig. 2. Metabolic activity of *C. reinhardtii* in control and atrazine exposed ($0.25 \mu\text{M}$) cultures. (A) and (C) control cultures at 3 and 24 h, respectively; (B) and (D) atrazine exposed cultures at 3 and 24 h, respectively. Arrows indicate the time of addition of FDA to unstained suspensions. Fluorescence generation rates are expressed in fluorescence arbitrary units min^{-1} . Kinetic plots represent one of two experiments. Values are shown as mean \pm SD of experimental duplicates. Asterisks (*) indicate significant differences ($P < 0.05$) vs. non-treated control.

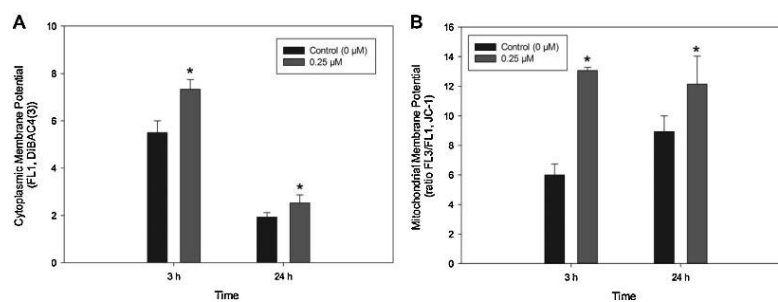


Fig. 3. Cytoplasmic (A) and mitochondrial (B) membrane potentials of *C. reinhardtii* in control cultures and atrazine exposed ($0.25 \mu\text{M}$) cultures at 3 and 24 h. Cytoplasmic membrane potential data were expressed as the percentage of depolarized cells vs. the total amount of cells analyzed per culture. Mitochondrial membrane potential changes were expressed as the mean orange (JC-1 oligomers)/green (JC-1 monomers) fluorescence intensity ratio. Values are shown as mean \pm SD of experimental duplicates. Asterisks (*) indicate significant differences ($P < 0.05$) vs. non-treated control. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

schemeier, 2013). Amino acids can be sorted as glucogenic or ketogenic according to the metabolic fate of their carbon skeletons. Several studies have shown that in microalgal species such as *C. reinhardtii* and *Chlorella vulgaris*, glucogenic amino acids can be converted to glucose through gluconeogenesis and ketogenic amino acids can be transformed into ketone bodies through ketogenesis and their degradation yield acetyl-CoA (Ahii et al., 2015; Johnson and Alric, 2013). These ketone bodies are produced to be used as energy. In *Arabidopsis*, the catabolism of amino acids was also proposed to fuel the tricarboxylic acid cycle (TCA) (Caldana et al., 2011).

The upregulated transcript of *MCCA* encodes the methylcrotonoyl-CoA carboxylase alpha subunit that is involved in the degradation of the branched-chain amino acid leucine. Specifically, the protein product is responsible for the fourth step in the breakdown of leucine, a ketogenic amino acid that is a building block of many proteins. So, Leu catabolism finally yields acetyl-CoA, for the formation of ketones or to be used as substrate for the TCA cycle (Johnson and Alric, 2013). The *AAH1* transcript was the most upregulated at 3 h (Table 1); it encodes a phenylalanine hydroxylase responsible for the conversion of phenylalanine to another amino acid, tyrosine (Vallon and Spalding, 2009). Tyrosine can also be broken down into smaller molecules that are used to produce energy. These two aromatic amino acids are both glucogenic and ketogenic. *GDH2* encodes a glutamate dehydrogenase that is involved in the glutamate catabolism (Vallon and Spalding, 2009). *CLR21* was the most upregulated transcript at 24 h (Table 1); it encodes a CLR family protein that is known to be involved in methionine catabolism. Both amino acids (Glu and Met) are glucogenic amino acids and the carbon skeletons originating from their oxidation can feed into the TCA cycle, leading to an accumulation of intermediates that can be further converted into longer-carbon-chain compounds via gluconeogenesis (Johnson and Alric, 2013).

Regarding to the energy category, 4 transcripts (*ICL1*, *PCK1B*, *ETFA* and *ETFB*) were significantly ($FDR \leq 0.01$ and $LFC \geq 1$ or ≤ -1) upregulated at both tested times (Table 1). The fact that most of the genes were related with energy generation pathways suggest that *C. reinhardtii* resorts to all available energy sources to properly acclimate to the stress conditions to maintain a healthy energy status. The *ICL1* transcript encodes the isocitrate lyase, a key enzyme of the glyoxylate cycle. The glyoxylate cycle generates intermediates that can be used to synthesize glucose (via gluconeogenesis). *ICL1* appears to function primarily in channeling acetyl-CoA through the glyoxylate shunt pathway for synthesis of amino acid precursors. This pathway bypasses a part of the TCA-cycle and produces glyoxylate and succinate. Glyoxylate in turn combines with another molecule of acetyl-CoA and generates malate, which then is converted to oxaloacetate by the enzyme malate dehydrogenase. Oxaloacetate could then be used (i) for the generation of aspartate and the pool of amino acids derived from it, (ii) to feed into the reverse glycolysis pathway via the generation of phosphoenolpyruvate by the reversible enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase (*PCK1*), also upregulated (Table 1) and (iii) to enter in another round of TCA-cycle/glyoxylate cycle to replenish TCA-cycle intermediates (Subramanian et al., 2014). In microorganisms, glucose is frequently not available, and other simple carbon compounds provide the only accessible carbon. The TCA cycle, with its two decarboxylation steps, does not permit assimilation of carbon and thus does not provide a route for the synthesis of macromolecules from C2 compounds. However, the glyoxylate pathway bypasses these decarboxylations, allowing C2 compounds to serve as carbon sources in gluconeogenesis and to be incorporated into glucose and, from there, into amino acids, DNA, and RNA (Lorenz and Fink, 2002). The study of Plancke et al. (2014) on cells of *C. reinhardtii* showed that *ICL1* has a central role in cellular metabolism

and the lack of isocitrate lyase is responsible for strong decrease in respiration rates and in the amounts of enzymes of the glyoxylate cycle and gluconeogenesis and, as a consequence, stimulation of amino acid synthesis from organic acids was observed. Furthermore, the higher *ICL* activity found in the present study may be an adaptation to promote mixotrophic carbon assimilation when photosynthetic carbon dioxide fixation is impaired (Sztrum et al., 2012) so this is related to the mechanism of action of atrazine. In other studies with *C. reinhardtii*, the abundances of transcripts associated with amino acid catabolism (e.g., *MCCA*) was shown to increase significantly when photosynthetic O_2 evolution was blocked by DCMU (Hemschemeier et al., 2013).

Other relevant transcripts related to energy metabolism were upregulated in this study. The *PCK1B* transcript encodes a phosphoenolpyruvate carboxykinase and the increased amounts of this gene suggested the induction of gluconeogenesis mentioned above. Also *ETFA* and *ETFB* were upregulated and these two transcripts encode the α - and β -subunit of electron-transfer flavoprotein. The increased abundances of transcripts related to amino acid catabolism together with the upregulation of *ETFA* and *ETFB* genes was also found by Hemschemeier et al. (2013) in dark-anoxic *C. reinhardtii* cells. Genetic and metabolic data indicate that plants subjected to darkness oxidatively degrade mainly Leu-Ile-Val-Phe-Trp and Tyr and transfer the electrons to the mitochondrial electron transport chain via electron-transfer flavoprotein and electron-transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase (ETF/ETFQO). Thereby, the ETF/ETFQO system allows cells to use electrons derived from diverse catabolic pathways for respiratory energy generation (Ishizaki et al., 2005, 2006).

Transcriptomic data correlated well with data obtained by flow cytometry. In general, the RNA-Seq data showed increased abundances of transcripts related to heterotrophic energy generation and electron disposal. These results are related with those obtained in the cytoplasmic membrane potential assay since this parameter provides information about the current transport and energy status of the cell (Konrad and Hedrich, 2008). Perturbations of the cytoplasmic membrane potential provide a sensitive and rapid indication of physicochemical changes in the extracellular environment and therefore they have been suggested to be mediators of subsequent physiological cellular responses to environmental stress factors (Rabinovitch and June, 1990). In the present work, a significant decline in cellular activity (Fig. 2) and a depolarization of the plasma membrane (Fig. 3A) were observed in the *C. reinhardtii* cells exposed to a sublethal atrazine concentration. The plasma membrane is the chemiosmotic barrier that provides the interface between the organism and its external environment. Across this phospholipid bilayer, a transmembrane electrochemical potential (negative inside) plays a pivotal role in the control of solute exchange, with the implication of large gradients between intracellular and extracellular concentrations of a variety of ions. It is an energy-requiring disequilibrium whose maintenance depends on the action of different channels and pumps (Lloyd et al., 2004). For this reason, *C. reinhardtii* cells under atrazine stress conditions required all energy storages for the preservation of their cytoplasmic membrane potential, viability and cellular homeostasis.

Flow cytometry data also showed an increase in the mitochondrial membrane potential (Fig. 3B), which can be interpreted as a stimulation of the mitochondrial activity and the data could support the hypothesis that another important source of energy for the microalgal cells might proceed from respiration (Loseva et al., 2004). As mentioned before, *ETFA* and *ETFB* genes, involved in the respiratory electron transport of the mitochondria, were upregulated. Cells might use electrons derived from diverse catabolic pathways, such as amino acid degradation, for respiratory energy generation. *C. reinhardtii* cells under atrazine stress conditions change their photosynthetic metabolism to a heterotrophic one,

Table 1
Differentially expressed genes of *C. reinhardtii*. Comparison of transcript abundances and fold-changes in cultures exposed to 0.25 μ M of atrazine for 3 h and 24 h vs. control cultures. For each comparison, a gene was deemed differentially expressed if it fitted the following criteria: significant log fold change ($\text{LFC} \leq -1$ or ≥ 1), and significant false discovery rate ($\text{FDR} \leq 0.01$). RPM means reads per million mapped reads.

Categories	Gene ID	Gene name	Average RPM (treatment) 3 h	Average RPM (control) 3 h	Log fold change 3 h	FDR 3 h	Average RPM (treatment) 24 h	Average RPM (control) 24 h	Log fold change 24 h	FDR 24 h	Description
Upregulated	205945	AAH1	41.44	9.58	2.23	9.51e-25	71.28	22.23	1.76	9.44e-13	Aromatic amino acid hydroxylase-related protein
Amino acids	193008	MCCA	22.68	6.17	1.98	3.21e-13	49.49	20.91	1.31	2.51e-05	Methylcrotonyl-CoA carboxylase alpha subunit
Amino acids	82916	GDH2	260.37	77.54	1.86	1.12e-11	484.00	208.26	1.30	3.58e-07	Glutamate dehydrogenase
Amino acids	186295	CLR21	5.90	3.00	1.09	0.00149	2.77	0.36	2.96	2.18e-06	Predicted protein of CLR family
Energy	191668	ICL1	3597.57	1628.07	1.26	9.73e-07	1735.18	730.41	1.31	0.00286	Iso citrate lyase
Energy	196612	PCK1B	2076.78	1022.10	1.13	0.000124	1190.77	588.79	1.08	0.000768	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, splice variant
Energy	189344	ETFA	10.27	5.17	1.11	0.000147	6.63	2.19	1.66	2.51e-05	Electron transfer flavoprotein alpha subunit
Energy	180281	ETFB	4.44	1.98	1.27	0.000752	3.72	1.28	1.61	0.000574	Electron transfer flavoprotein beta subunit
Metabolism	24240	RHP-2	86.95	31.51	1.58	1.06e-10	71.78	28.32	1.42	5.72e-09	Rh protein
ROS and stress	196820	GOX9	11.42	4.95	1.33	9.28e-06	10.71	4.25	1.41	0.000724	Glyoxal or galactose oxidase
Gene expression	142698	PK01b-1	28.18	14.02	1.12	2.29e-06	50.88	25.99	1.05	0.000409	Peptidyl-L-prolyl cis-trans isomerase
Downregulated	184661	NIT1	23.79	68.81	-1.43	2.59e-07	22.15	62.42	-1.43	3.53e-07	Nitrate reductase
Redox											

because the herbicide exerts its mechanism of action on the photosystem II (Marchetti et al., 2013; Rutherford and Krieger-Liszka, 2001), thus reducing the photosynthetic activity and due to this reason the microalgal cells try to get energy through heterotrophic metabolism for being able to maintain its viability (Fig. 1).

In the gene expression category, one transcript (*FKB16-1*) was upregulated in cultures exposed to the herbicide (Table 1). This gene encodes a peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase involved in post-transcriptional modification processes such as protein folding. In the ROS and stress category, the *GOX9* transcript was upregulated. This gene encodes a glyoxal or galactose oxidase related with antioxidant defense mechanisms. These results suggest that atrazine increased the intracellular ROS levels and provoked an oxidative stress in *C. reinhardtii* cells (Mofeed and Mosleh, 2013). We found similar results with the herbicide paraquat in cells of *C. moewusii* (Prado et al., 2012a) since this compound induced oxidative stress and a decrease in metabolic activity.

Also, as a result of amino acid catabolism, large amount of ammonium is produced and this ammonium should be excreted for the maintenance of the osmotic equilibrium of the cell. The induction of ammonium transport was indicated by increased amount of the *RHP-2* transcript since it encodes a Rh protein implicated in ammonium/CO₂ transmembrane transport (Soupene et al., 2004). Moreover, regarding to nitrogen metabolism, there was one down-regulated transcript (*NIT1*) in cultures exposed to atrazine (Table 1). *NIT1* encodes a nitrate reductase, which catalyses the first step of nitrate assimilation. Nitrate is reduced to nitrite by nitrate reductase and then, nitrite reductase catalyses its reduction to ammonium. The expression of *NIT1* is repressed by ammonium and induced by ammonium starvation (de Montaigu et al., 2010). In this case, this gene was downregulated due to the amounts of ammonium produced as we discussed above. Nitrate reductase activity decreased in cells of *C. moewusii* exposed to paraquat (Prado et al., 2009b) in a concentration-dependent manner and similar results were also obtained in *C. reinhardtii* exposed to atrazine (unpublished data). Decreased expression of genes controlling nitrogen assimilation has also been observed upon exposure to heavy metals and atrazine in the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* (Qian et al., 2012). Nitrogen assimilation and carbon fixation are highly coordinated in unicellular algae, so that an herbicide that finally should interfere in the photosynthetic carbon fixation goes on to also interfere in enzymatic activities in nitrogen assimilation (Prado et al., 2009b).

4. Conclusions

A sublethal concentration of atrazine alters the energy status of *C. reinhardtii* cells. Using flow cytometric protocols a decrease of cellular activity, a plasma membrane depolarization and a hyperpolarization of the mitochondrial membrane were detected in atrazine exposed cells respect to control cells. RNA-Seq analysis also indicated this energy alteration since the transcriptomic data revealed higher abundances of transcripts related to heterotrophic energy generation and electron disposal in the stressed cells. Despite these alterations, the cells were able to overcome stress and maintain cellular viability, thus *C. reinhardtii* showed an important adaptability to the adverse conditions.

Acknowledgements

This work was carried out with the financial support of the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (CGL2010-15993/BOS). M.E. acknowledges a pre-doctoral fellowship from the Xunta de Galicia (Spain).

References

- Ahii, M., Teresa, A., Grac, M., Parrish, C.C., 2015. Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Aquat. Toxicol.* 160, 87–95.
- Brookes, J.D., Geary, S.D., Ganf, G.G., Burch, M.D., 2000. Use of FDA and flow cytometry to assess metabolic activity as an indicator of nutrient status in phytoplankton. *Mar. Freshwater Res.* 51, 817–823.
- Caldana, C., Degenkolbe, T., Cuadros-Inostroza, A., Klie, S., Sulpice, R., Leisse, A., Steinhäuser, D., Fernie, A.R., Willmitzer, L., Hannah, M.A., 2011. High-density kinetic analysis of the metabolomic and transcriptomic response of *Arabidopsis* to eight environmental conditions. *Plant J.* 67, 869–884.
- Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, M.P., Saoncella, A., 2001. An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Wat. Res.* 35, 69–76.
- Cassart, D., Fett, T., Sarlet, M., Baise, E., Coignoul, F., Desmecht, D., 2007. Flow cytometric probing of mitochondrial function in equine peripheral blood mononuclear cells. *BMC Vet. Res.* 3, 25–31.
- Chankova, S.G., Dimova, E.G., Mitrovska, Z., Miteva, D., Mokerova, D.V., Yonova, P.A., Yurina, N.P., 2014. Antioxidant and HSP70B responses in *Chlamydomonas reinhardtii* genotypes with different resistance to oxidative stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 101, 131–137.
- Chen, J., Huo, J., Jia, Z., Song, Y., Li, Y., Zhang, L., 2015. Effects of atrazine on the proliferation and cytotoxicity of murine lymphocytes with the use of carboxyfluorescein succinimidyl ester-based flow cytometric approaches. *Food Chem. Toxicol.* 76, 61–69.
- Choi, C.J., Berges, J.A., Young, E.B., 2012. Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll a fluorescence: variable responses among freshwater microalgae. *Wat. Res.* 46, 2615–2626.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 1, 581–585.
- Costantini, P., Petronilli, V., Colonna, R., Bernardi, P., 1995. On the effects of paraquat on isolated mitochondria. Evidence that paraquat causes opening of the cyclosporine A-sensitive permeability transition pore synergistically with nitric oxide. *Toxicology* 99, 77–88.
- de Montaigu, A., Sanz-Luque, E., Galván, A., Fernández, E., 2010. A soluble guanylate cyclase mediates negative signaling by ammonium on expression of nitrate reductase in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 22, 1532–1548.
- Dewez, D., Geoffroy, L., Vernet, C., Popovic, R., 2005. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquat. Toxicol.* 74, 150–159.
- Didur, O., Perreault, F., Ouakroum, A., Dewez, D., Popovic, R., 2012. Alteration of photosystem II activity by atrazine on *Chlamydomonas reinhardtii* synchronized and asynchronous cell cycle cultures. *Toxicol. Environ. Chem.* 94, 906–917.
- Fischer, B.B., Rüfenacht, K., Dannenhauer, K., Wiesendanger, M., Eggen, R.L.L., 2010. Multiple stressor effects of high light irradiance and photosynthetic herbicides on growth and survival of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2211–2219.
- González-Barreiro, O., Rioboo, C., Cid, A., Herrero, C., 2004a. Atrazine-induced chlorosis in *Synechococcus elongatus* cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 301–307.
- González-Barreiro, O., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2006. Removal of atrazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms. *Environ. Pollut.* 144, 266–271.
- Harris, E.H., 1989. *The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*. Academic Press, San Diego.
- Harris, E.H., 2001. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 363–406.
- Hayes, T.B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., Adame, L., Chan, E., Buchholz, D., Stueve, T., Gallipeau, S., 2010. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 4612–4617.
- Hemschemeier, A., Casero, D., Liu, B., Benning, C., Pellegrini, M., Happe, T., Merchant, S.S., 2013. Copper response regulator 1-dependent and independent responses of the *Chlamydomonas reinhardtii* transcriptome to dark anoxia. *Plant Cell* 25, 3186–3211.
- Huc, L., Lemarié, A., Guéraud, F., Hélieux-Toussaint, C., 2012. Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro* 26, 709–717.
- Ishizaki, K., Larson, T.R., Schauer, N., Fernie, A.R., Graham, I.A., Leaver, C.J., 2005. The critical role of *Arabidopsis* electron-transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductase during dark-induced starvation. *Plant Cell* 17, 2587–2600.
- Ishizaki, K., Schauer, N., Larson, T.R., Graham, I.A., Fernie, A.R., Leaver, C.J., 2006. The mitochondrial electron transfer flavoprotein complex is essential for survival of *Arabidopsis* in extended darkness. *Plant J.* 47, 751–760.
- ISO 8692, 2012. *Water Quality-Fresh Water Algal Growth Inhibition Test With Unicellular Green Algae*. International Organization for Standardization, Suiza.
- Jamers, A., Blust, R., De Coen, W., 2009. Omics in algae: paving the way for a systems biological understanding of algal stress phenomena? *Aquat. Toxicol.* 92, 114–121.

- Jamers, A., De Coen, W., 2010. Effect assessment of the herbicide paraquat on a green alga using differential gene expression and biochemical biomarkers. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 893–901.
- Johnson, X., Alric, J., 2013. Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. *Eukaryotic Cell* 12, 776–793.
- Konrad, K.R., Hedrich, R., 2008. The use of voltage-sensitive dyes to monitor signal-induced changes in membrane potential-ABA triggered membrane depolarization in guard cells. *Plant J.* 55, 161–173.
- Koo, H.-J., Piao, Y., Pak, Y.K., 2012. Endoplasmic reticulum stress impairs insulin signaling through mitochondrial damage in SH-SY5Y cells. *Neurosignals* 701, 265–280.
- Krol, E., Dziubinska, H., Trebacz, K., 2003. Low-temperature induced transmembrane potential changes in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Plant Cell Physiol.* 44, 527–533.
- Liu, X., Li, W.J., Li, L., Yang, Y., Mao, L.G., Peng, Z., 2014. A label-free electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles for direct detection of atrazine. *Sens. Actuators B* 191, 408–414.
- Lloyd, D., Harris, J.C., Biagini, G.A., Hughes, M.R., Maroulis, S., Bernard, C., Wadley, R.B., Edwards, M.R., 2004. The plasma membrane of microaerophilic protists: oxidative and nitrosative stress. *Microbiology* 150, 1183–1190.
- Lopez, D., Casero, D., Cokus, S.J., Merchant, S.S., Pellegrini, M., 2011. Algal functional annotation tool: a web-based analysis suite to functionally interpret large gene lists using integrated annotation and expression data. *BMC Bioinf.* 12, 282.
- Lorenz, M.C., Fink, G.R., 2002. Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryotic Cell* 1, 657–662.
- Loveva, N., Gordon, L., Alyabyev, A., Andreyeva, I., Kolesnikov, O., Chernov, V., Kemp, R.B., 2004. Effect of induced changes in membrane permeability on the defence response of *Chlorella vulgaris* to infection by *Acholeplasma laidlawii*. *Thermochim. Acta* 422, 95–100.
- Ma, J., Wang, S., Wang, P., Ma, L., Chen, X., Xu, R., 2006. Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 456–462.
- Marchetti, G., Minella, M., Mauro, V., Minero, C., Vione, D., 2013. Photochemical transformation of atrazine and formation of photointermediates under conditions relevant to sunlight surface waters: laboratory measures and modeling. *Wat. Res.* 47, 6211–6222.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Marechal-Drouard, L., et al., 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318, 245–250.
- Mofeed, J., Moseleh, Y.Y., 2013. Toxic responses and antioxidant enzymes activity of *Scenedesmus obliquus* exposed to fenhexamid and atrazine, alone and in mixture. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 95, 234–240.
- Nestler, H., Groh, K.J., Schönenberger, R., Behra, R., Schirmer, K., Eggen, R.I.L., Suter, M.J.F., 2012. Multiple-endpoint assay provides a detailed mechanistic view of responses to herbicide exposure in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 110–111, 214–224.
- OECD, 2011. Alga, Growth Inhibition Test (201). OECD Guideline for Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- Palmeira, C.M., Moreno, A.J., Madeira, V.M.C., 1995. Mitochondrial bioenergetics is affected by the herbicide paraquat. *Biochim. Biophys. Acta* 1229, 187–192.
- Plancke, C., Vigeolas, H., Höhner, R., Roberty, S., Emmonds-Alt, B., Larosa, V., Remacle, C., 2014. Lack of isocitrate lyase in *Chlamydomonas* leads to changes in carbon metabolism and in the response to oxidative stress under mixotrophic growth. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 77, 404–417.
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Abalde, J., Cid, A., 2009a. Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in microalgae exposed to the herbicide paraquat. *Environ. Int.* 35, 240–247.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2009b. The herbicide paraquat induces alterations in the elemental and biochemical composition of non-target microalgal species. *Chemosphere* 76, 1440–1444.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Suarez-Bregua, P., Cid, A., 2012a. Flow cytometric analysis to evaluate physiological alterations in herbicide-exposed *Chlamydomonas moewusii* cells. *Ecotoxicology* 21, 409–420.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2012b. Screening acute cytotoxicity biomarkers using a microalga as test organism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 86, 219–226.
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2015. Suitability of cytotoxicity endpoints and test microalgal species to disclose the toxic effect of common aquatic pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 114, 117–125.
- Qian, H., Pan, X., Chen, J., Zhou, D., Chen, Z., Zhang, L., Fu, Z., 2012. Analyses of gene expression and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* reveal the phytotoxicities of three environmental pollutants. *Ecotoxicology* 21, 847–859.
- Rabinovitch, P.S., June, C.H., 1990. Intracellular ionized calcium, membrane potential, and pH. In: Ormerod, M.G. (Ed.), *Flow Cytometry, A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, pp. 161–185.
- Reboud, X., Majerus, N., Gasquez, J., Powles, S., 2007. *Chlamydomonas reinhardtii* as a model system for pro-active herbicide resistance evolution research. *Biol. J. Linn. Soc.* 91, 257–266.
- Rioboo, C., Prado, R., Herrero, C., Cid, A., 2007. Population growth study of the rotifer *Brachionus* sp. fed with triazine-exposed microalgae. *Aquat. Toxicol.* 83, 247–253.
- Rutherford, A.W., Krieger-Liszka, A., 2001. Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends Biochem. Sci.* 6, 648–653.
- Sjollema, S.B., Martinegarcía, G., van der Geest, H.G., Kraak, M.H.S., Booij, P., Vethaak, A.D., Admiraal, W., 2014. Hazard and risk of herbicides for marine microalgae. *Environ. Pollut.* 187, 106–111.
- Soupe, E., Inwood, W., Kustu, S., 2004. Lack of the Rhesus protein Rh1 impairs growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* at high CO₂. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 7787–7792.
- Subramanian, V., Dubini, A., Astling, D.P., Laurens, L.M.L., Old, W.M., Grossman, A.R., Seibert, M., 2014. Profiling *Chlamydomonas* metabolism under dark, anoxic H₂-producing conditions using a combined proteomic, transcriptomic, and metabolomic approach. *J. Proteome Res.* 13, 5431–5451.
- Sztrum, A.A., Sabatini, S.E., Rodríguez, M.C., 2012. Isocitrate lyase activity and antioxidant responses in copper-stressed cultures of *Chlamydomonas reinhardtii* (Volvocales, Chlorophyceae). *Phycologia* 51, 135–143.
- Törnqvist, R., Jarsjö, J., Karimov, B., 2011. Health risks from large-scale water pollution: trends in Central Asia. *Environ. Int.* 37, 435–442.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2012. Guidelines for water reuse. In: EPA/600/R-12/618. U.S. EPA, Washington D.C.
- Vallon, O., Spalding, M.H., 2009. Amino acid metabolism. In: Stem, D., Harris, E.H. (Eds.), *The Chlamydomonas Sourcebook*, Vol. II. Elsevier, Dordrecht, The Netherlands, pp. 115–158.
- Vicente, J.A.F., Peixoto, F., Lopes, M.L., Madeira, V.M.C., 2001. Differential sensitivities of plant and animal mitochondria to the herbicide paraquat. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15, 322–330.
- Wallace, D.C., 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases aging and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39, 359–407.
- Weiner, A.J., Delorenzo, M.E., Fulton, M.H., 2004. The herbicide atrazine in selected microalgal species. *Aquat. Toxicol.* 68, 121–128.
- Wickens, H.J., Pinney, R.J., Mason, D.J., Gant, V.A., 2000. Flow cytometric investigation of filamentation, membrane patency, and membrane potential in *Escherichia coli* following ciprofloxacin exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 682–687.

4.3. Capítulo III: “Does a short-term exposure to atrazine provoke cellular senescence in *Chlamydomonas reinhardtii*?”

Los organismos pluricelulares y unicelulares viven en una lucha constante para hacer frente a agentes dañinos tanto extrínsecos como intrínsecos. La acumulación de daños a través del ciclo de vida conlleva al deterioro de componentes y al mal funcionamiento de la célula provocando fenómenos de senescencia celular. En los ecosistemas naturales, las microalgas tienen que adaptarse a las condiciones ambientales heterogéneas y a la escasez de nutrientes, lo que desencadena fenómenos de senescencia celular o muerte celular programada (PCD). Este fenómeno es análogo al que ocurre en los cultivos microalgales que crecen en sistemas cerrados (*Bach culture*). El crecimiento de los cultivos se caracteriza por tener una fase logarítmica, donde hay suficientes nutrientes que permiten altos ratios de crecimiento. A continuación los nutrientes empiezan a agotarse y las células entran en fase estacionaria. Durante esta fase la división celular cesa y las células entran en senescencia celular, donde se interrumpe el ciclo celular para evitar la proliferación de células dañadas. Durante esta etapa las células experimentan cambios estructurales y metabólicos. Incluso si nuevos nutrientes se añaden en el medio muchas células no serán capaces de volver a su estado de crecimiento, el proceso de senescencia no será reversible y las células morirán.

El objetivo de este estudio fue investigar el impacto y modo de acción de un químico, el herbicida atrazina, y de la escasez de nutrientes sobre el proceso de senescencia celular en la microalga de agua dulce *Chlamydomonas reinhardtii*. Para ello cultivos microalgales en fase exponencial fueron expuestos a una concentración subletal de atrazina (0,25 μM) durante 24 h. Además cultivos no expuestos a atrazina fueron también monitorizados para evaluar la potencial presencia de características de senescencia en cultivos en fase estacionaria (96 h). Diferentes parámetros celulares y moleculares relacionados con los fenómenos de senescencia fueron analizados: viabilidad celular, niveles citosólicos de Ca^{2+} fueron evaluados para estudiar la transducción de la señal y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y peroxidación lipídica para determinar el estado de estrés oxidativo de las células microalgales. Además, se analizaron mediante RT-qPCR las respuestas transcripcionales de genes relacionados con el estrés oxidativo para estudiar la posible activación del sistema antioxidante. Finalmente, diferentes parámetros relacionados con la PCD fueron investigados, como la actividad caspasa, alteraciones en la morfología nuclear y presencia de autofagosomas.

Todos los parámetros analizados mostraron el mismo patrón de respuesta para los dos tratamientos, excepto para los niveles intracelulares de calcio, donde los resultados obtenidos sugieren que este ión puede actuar como un mensajero transitorio en la transducción de la

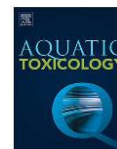
señal en las células de *C. reinhardtii* sometidas a condiciones de estrés, ya que un incremento fue detectado después de una exposición corta a atrazina. Ambos tratamientos experimentales provocan un incremento en la generación de ROS, sugiriendo que el mecanismo común de acción entre ambos tratamientos (químico y escasez de nutrientes) puede ser el estrés oxidativo. Además, la modificación de la expresión de genes relacionados con actividad antioxidante observada en este trabajo, ya sea un incremento (*GST* y *APX I*) o una disminución (*CAT*, *GPX* y *SOD-1*), sugiere un sistema antioxidante versátil y flexible en respuesta a la sobreproducción de ROS. Este incremento en los niveles de ROS puede estar relacionado con la aparición de marcadores de PCD en ambos tratamientos experimentales. Cultivos no expuestos a la atrazina y en fase estacionaria muestran activación de caspasas, alteraciones en la morfología del núcleo y presencia de autofagosomas en las células de *C. reinhardtii*, indicando senescencia celular en estos cultivos. Estas características de senescencia también aparecen en niveles similares de alteración en los cultivos expuestos a atrazina durante 24 h. Finalmente, la disminución observada en ambos tratamientos en la peroxidación lipídica puede estar relacionada con el incremento observado de vacuolas autofágicas que reciclan material dañado, como los lípidos alterados en las membranas microalgales.

Las microalgas son sensibles a multitud de químicos y debido a sus ciclos de vida cortos, proporcionan las primeras señales de los impactos en los ecosistemas. Su importancia como productoras primarias y su rol en los ciclos del nitrógeno y fósforo las hace fundamentales en los ecosistemas acuáticos. Las alteraciones moleculares y celulares obtenidas en este trabajo sugieren que la exposición a sustancias químicas, como la atrazina, induce una sobreproducción de ROS que conlleva a fenómenos de senescencia celular en las poblaciones microalgales, comprometiendo la biodiversidad, estructura y función de los niveles más altos de la cadena trófica en los ecosistemas de agua dulce.



Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqtox

Does a short-term exposure to atrazine provoke cellular senescence in *Chlamydomonas reinhardtii*?

Marta Esperanza^a, Magali Houde^b, Marta Seoane^a, Ángeles Cid^a, Carmen Rioboo^{a,*}^a Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad da Coruña, Campus de A Zapateira s/n 15071. A Coruña, Spain^b Environment and Climate Change Canada, Aquatic Contaminants Research Division, 105 McGill Street, Montreal, QC, H2Y 2E7, Canada

ARTICLE INFO

Keywords:

Microalga
Aquatic toxicology
Oxidative stress
Gene transcription
Cellular senescence
Programmed cell death

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the impacts and modes of action of a chemical and nutrient deprivation on the cellular senescence process of *Chlamydomonas reinhardtii*. Several molecular and cellular parameters related to senescence phenomena were monitored in *C. reinhardtii* cells exposed for 24 h to a sublethal concentration (0.25 μM) of the herbicide atrazine and in unexposed 96 h cells in an early stationary phase of growth. All endpoints showed the same pattern of response between treatments, except for the intracellular level of calcium, where a significant increase was observed in 24 h-exposed cultures compared to 24 h-log controls. Results also indicated that cell viability remained above 98% for all conditions. Reactive oxygen species (ROS) levels and caspase activity increased in all experimental cultures with respect to 24 h-log controls and alterations in the nuclear morphology and cells with auto-phagosomes were observed in all treatments. However, a decrease in lipid peroxidation was detected which could be related to the observed increment of autophagic vacuoles that recycle damaged material, such as altered lipids in microalgal membranes.

Furthermore, responses at the molecular level were also investigated. Gene transcription analyses, carried out by RT-qPCR technique, indicated an increase in transcripts for genes encoding glutathione S-transferase (*GST*) and ascorbate peroxidase (*APX 1*) and a decrease for those encoding catalase (*CAT*), glutathione peroxidase (*GPX*) and Mn-superoxide dismutase (*SOD-1*) in both experimental treatments. Overall molecular and cellular results suggest that a short-term exposure to a sublethal concentration of atrazine may induce senescence features in microalgal cells which are the base of aquatic food webs.

1. Introduction

Unicellular and multicellular organisms live in a constant struggle to cope with extrinsic and intrinsic damaging agents. The inevitable accumulation of damage throughout the life cycle leads to the deterioration of cell components and the impairment of cellular functions (Campisi, 2007) provoking cellular senescence. Many cellular challenges for organisms originate from limitations in the maintenance and repair mechanisms of DNA or by anomalies in the antioxidant mechanisms that contribute to the detoxification of reactive oxygen species (ROS) (Van Heemst et al., 2007). In fact, many features of senescence result from the incapacity of cells to adapt to stress conditions and when damage accumulates irreversibly, mitotic cells rely on either of two mechanisms to avoid replication: they can permanently arrest

the cell cycle or trigger cell death programs (Vicencio et al., 2008). On the one hand, apoptosis is the best-described form of programmed cell death (PCD) that can occur through processes such as chromatin condensation and margination, DNA cleavage with unchanged cytoplasm and organelles, and an increase in cytosolic calcium concentration and in the activity of a family of cysteine proteases named caspases (Danon et al., 2000; Hoeberichts and Woltering, 2003). On the other hand, autophagy (i.e., self-eating), which is a lysosomal degradation pathway essential for homeostasis, may contribute to cell death as well (Vicencio et al., 2008); the typical hallmark of this phenomena is the presence of auto-phagosomes in the cytoplasm of cells (Pérez-Pérez et al., 2010, 2012).

In aquatic ecosystems, unicellular organisms, such as microalgae, are exposed to a heterogeneous natural environment and have to deal

Abbreviations: APX, ascorbate peroxidase; ATZ, atrazine; a.u., arbitrary units; BTUB, beta tubulin; CBLP, G protein beta subunit-like polypeptide; CAT, catalase; DAPI, 4'-diamidino-2-phenylindole; DGR, daily growth rate; DHR123, dihydrorhodamine 123; EB, ethidium bromide; FCM, flow cytometry; FS, forward scatter light; GST, glutathione S-transferase; GPX, glutathione peroxidase; MDA, malondialdehyde; MDC, monodansylcadaverine; PCD, programmed cell death; PI, propidium iodide; ROS, reactive oxygen species; RT, room temperature; RT-qPCR, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; SOD, Mn-superoxide dismutase; SS, side scatter light; TCA, tricarboxylic acid cycle; UBCX, ubiquitin-conjugating enzyme E2

* Corresponding author.

E-mail addresses: carmen.rioboo.blanco@gmail.com, carmen.rioboo@udc.es (C. Rioboo).<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.015>

Received 26 April 2017; Received in revised form 9 June 2017; Accepted 17 June 2017

Available online 19 June 2017

0166-445X/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

with nutrient patchiness. Thus, when unicellular populations increase, nutrients become depleted leading to senescence or cell death. This phenomenon is analogous to cultures grown in closed systems (batch culture) under laboratory conditions (Humby et al., 2013). Batch culture growth is characterized as having a logarithmic growth phase where nutrients are sufficient to support high rates of growth. Then, as cell number increases and nutrients become depleted, there is a transition to a stationary phase where division ceases and cell numbers are maintained, which is generally referred to as cellular senescence (Franklin et al., 2006; Fredriksson and Nyström, 2006). Cellular senescence is a stable form of cell cycle arrest that limits the proliferation of damaged cells (White and Lowe, 2009); it is under this phase that cells undergo metabolic and structural changes that can lead to death and the loss of cell numbers (Fogg and Thake, 1987; Wanner and Egli, 1990). Even if new nutrients were added in the medium many cells are not capable of returning to its growth state, i.e., the cellular senescence process will not be reversible and cells will die (Franklin and Berges, 2004; Fredriksson and Nyström, 2006). In particular, PCD has been observed in microalgae exposed to several stressors, such as natural toxicants (i.e., ochratoxin) (Sorrenti et al., 2013), metals (Bahadar et al., 2014; Cid et al., 1996), radiation (Sanches Silveira and Myaki Pedroso, 2014) and pesticides (Zhang et al., 2012); however the link between these stresses and PCD remains unknown.

Atrazine (ATZ) is one of the triazine herbicides most extensively applied in agriculture all over the world and used as a chemical stressor in this work. Atrazine inhibits photosynthesis blocking the photosynthetic electron transport at photosystem II (Rutherford and Krieger-Liszka, 2001) and thereby energy production, preventing CO₂ fixation in target and non-target organisms. Detrimental effects of atrazine on aquatic ecosystems and ATZ-induced alterations of aquatic community structures have been previously reported (Choi et al., 2012; Didur et al., 2012; Sjöllema et al., 2014 and Weiner et al., 2004). Due to environmental concerns, some triazines, including atrazine, have been banned in Europe (European Commission (SANCO/10496/2003-final), 2003). However, atrazine is still detected in the environment together with the triazines in use nowadays (Loos et al., 2009 and Ma et al., 2006). This is due to their long retention time in the soil and aquifers, which leads to perdurable leaching and long-lasting levels in different ecosystems even years after their prohibition (Lorente et al., 2014) at concentrations exceeding 10 µg L⁻¹ (USEPA, 2012).

Among aquatic microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii* was used in this work. This freshwater species is currently used extensively in biological research and in molecular genetic studies as a model organism because of its ease of cultivation, rapid growth, haploidy and possibility of inducing sexual reproduction (Harris, 1989, 2001), as well as the knowledge of its sequenced genome (Merchant et al., 2007). Previous studies using transcriptomic, proteomic and cytomic analyses showed that atrazine altered the energy status of *C. reinhardtii* cells and provoked an inhibition of photosynthesis that affected the entire physiological and biochemical state of microalgal cells (Esperanza et al., 2016). Despite these alterations, cells were able to overcome stress and maintain cellular viability after 3 and 24 h of atrazine exposure (0.25 µM), suggesting that *C. reinhardtii* shows an important adaptability to the adverse conditions (Esperanza et al., 2015a). The potential stimulation of the antioxidant defence mechanisms could be involved in this adaptation to oxidative stress.

The aim of the present work was to evaluate the effects of chemical exposure and nutrient deprivation on the molecular and cellular functions of green unicellular algae in order to study the potential occurrence of cellular senescence processes in *C. reinhardtii*. To do so, microalgal cultures in exponential phases were exposed to a sublethal concentration of the herbicide atrazine (0.25 µM) for acute 24 h. Unexposed cultures were also monitored over time to evaluate potential senescence features in stationary cultures (96 h). Several molecular and cellular parameters related to senescence process were studied: cytosolic levels of Ca²⁺ were evaluated to study signal transduction, and

ROS production and lipid peroxidation measured to determine the oxidative stress status in microalgal cells. Moreover, the transcriptional responses of oxidative stress-related genes were measured using RT-qPCR for studying the potential activation of antioxidant enzyme system. Finally different hallmarks of PCD, such as caspase activity, nuclear morphological alterations and presence of auto-phagosomes were also investigated.

2. Materials and methods

2.1. Microalgal cultures

The unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard (strain CCAP 11/32A mt +) was obtained from the Culture Collection of Algae and Protozoa of Dunstaffnage Marine Laboratory (Scotland, UK) and Canadian phycological culture center (Toronto, Canada). *C. reinhardtii* cells were cultured in Tris-minimal phosphate medium (Harris, 1989) on a rotary shaker set at 150 rpm, under controlled conditions: 22 ± 1 °C and illuminated with 100 µmol photon m⁻² s⁻¹ under a 12:12 h light:dark cycle. Initial cell density for each experiment was 2 × 10⁵ cells mL⁻¹, with the aim of having stationary cultures at 96 h (Fig. 1).

The atrazine (ATZ) concentration used (0.25 µM) in the present study was based on 96 h EC₅₀ determined by previous growth toxicity tests (Esperanza et al., 2016). Before each experiment, fresh stock solutions of atrazine were prepared by dissolving the pure compound (Sigma-Aldrich, MW: 215.68, purity: 98.8%) in methanol and filtering through 0.2 µm membrane filters. To achieve this nominal concentration, stock solutions volume added to the microalgal cultures never exceed 0.05% of final volume. A statistical comparison between 0.05% methanol controls and no-solvent controls revealed no significant difference in algal growth (*t*-test; *p* > 0.05), and all subsequent tests were performed using only the solvent control. Nominal and effective concentrations of atrazine were found to be similar following a gas chromatography/mass spectrometry analyses (Fernández-Naveira et al., 2016) indicating stable concentrations through time in microalgal cultures.

All cultures were carried out in triplicate and at least two independent experiments were conducted for each parameter analysed. Microalgal cultures were incubated without herbicide (control log culture) for 24 h, corresponding to a complete light:dark cycle where cells were in logarithmic phase. Other cultures were incubated for 24 h with 0.25 µM of atrazine (ATZ exposed culture) to analyse an acute exposure of this herbicide. Furthermore, microalgal cultures without atrazine (unexposed stationary cultures) were kept for 96 h in the incubator for doing the analysis when cells are in stationary phase (Fig. 1). All cultures were incubated under controlled light, temperature and agitation conditions.

2.2. Flow cytometric analyses

Cell suspensions (2 × 10⁵ cells mL⁻¹) were incubated with the appropriate fluorochrome at room temperature (RT) and in darkness. The lowest fluorochrome concentration and the shortest incubation time were chosen in order to obtain significant and stable staining of cells without toxicity being developed. FCM analyses of *C. reinhardtii* cells were performed on a Beckman-Coulter Gallios flow cytometer fitted with 488 nm and 633 nm excitation lasers, detectors of forward (FS) and side (SS) light scatter and four fluorescence detectors corresponding to different wavelength intervals: 505–550 nm (FL1), 550–600 nm (FL2), 600–645 nm (FL3) and > 645 nm (FL4). The 488 nm argon-ion laser was used as excitation source for all the probes assayed. Forward scatter (FS, an estimation of cell size) and red autofluorescence (FL4 channel, an estimation of cell chlorophyll a content) dot-plots were used to characterise the microalgal population, setting gating levels in order to exclude non-microalgal particles. At least

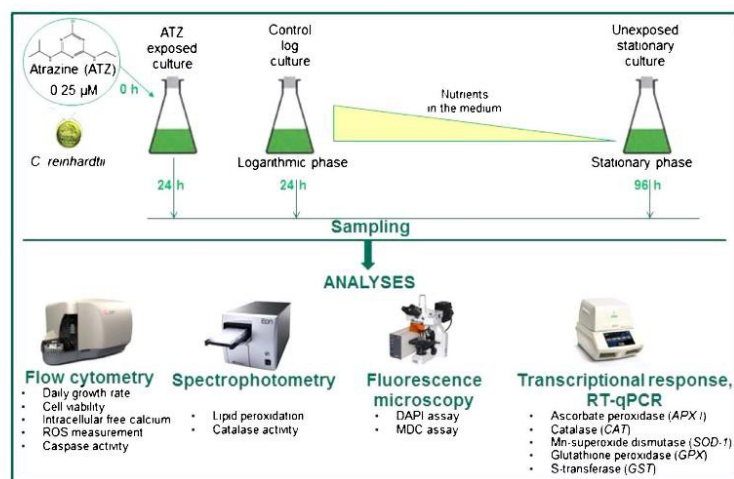


Fig. 1. Experimental design to investigate the effects of atrazine and depletion of nutrients on the molecular and cellular functions of *C. reinhardtii*.

10,000 gated cells per sample were collected and analysed using Kaluza software version 1.1 (Beckman Coulter). All FCM determinations were performed at least twice and duplicate samples were run on the flow cytometer.

2.2.1. Growth measurement and cell viability determination

Growth of microalgal cultures was measured by counting culture aliquots with a flow cytometer using a suspension of fluorochrome-containing micro-spheres for its calibration (FlowCount Fluorospheres, Beckman Coulter Inc.). Daily growth rates (DGR) (day^{-1}) for unexposed and exposed (0.25 μM of atrazine) cultures were calculated for periods of 24 h using the following formula: $\text{DGR} = [\ln(N_t) - \ln(N_0)] / \ln 2(t - t_0)$, where N_t is the cell density at time t and N_0 is the cell density at time 0.

FCM assay based on dye exclusion of the probe propidium iodide (PI) was used to identify cells with intact plasma membrane. PI was used to discriminate between viable non-fluorescent cells and non-viable fluorescent cells with cell membrane damage. *C. reinhardtii* cells were incubated with 4 μM of PI for 15 min prior samples were analysed by FCM (Prado et al., 2009). The orange fluorescent emission of PI was collected in the FL3 channel indicated above. Results were expressed as the percentage of viable cells vs. the total amount of cells analysed by FCM.

2.2.2. Intracellular free calcium

The FCM assay based on dye exclusion of the probe Calcium Green-1 acetoxyethyl ester was used to detect changes in cytosolic free Ca^{2+} levels. The cell-permeant acetoxyethyl ester, which is non-fluorescent and Ca^{2+} insensitive, can be passively loaded into cells where it is cleaved by ubiquitous intracellular esterases to the cell-impermeant fluorescent product Calcium Green-1. This cellular product exhibits an increase in fluorescent emission intensity (530 nm) upon binding to Ca^{2+} . As previously described in Prado et al., 2012b; *C. reinhardtii* cell suspensions were incubated with the fluorochrome (final concentration: 8 μM) at 30 °C for 2 h. The fluorochrome green fluorescent emission was collected in the FL1 channel. Data were collected as the mean fluorescence value of the cell population since data showed a normal distribution (Prado et al., 2012b).

2.2.3. Oxidative stress determination

Oxidative stress in *C. reinhardtii* was evaluated by FCM using determinations of intracellular levels of hydrogen peroxide (H_2O_2) with

an oxidation-sensitive fluorescent dye, dihydrorhodamine 123 (DHR123). DHR123 was added at a final concentration of 29 μM for 40 min to the cell suspensions (2×10^5 cells ml^{-1}). Since data were normally distributed, mean fluorescence values of orange-ethidium bromide (EB) were collected in the FL3 channel (Prado et al., 2012a).

2.2.4. Caspase activity

A flow cytometric assay was performed following the manufacturer's instructions using CellEvent Caspase-3/7 Green kit (Molecular Probes) to study the caspase activity in *C. reinhardtii* cells (González-Pleiter et al., 2017). The CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent is a four-amino acid peptide (DEVD) conjugated to a nucleic acid-binding dye with absorption/emission maxima of 502/530 nm. DEVD peptide inhibits the ability of the dye to bind to DNA. However, after activation of caspase-3/7 in damaged cells, the DEVD peptide is cleaved, enabling the dye to bind to DNA and produce a bright fluorogenic response. The green fluorescent emission of the dye was collected in the FL1 channel. Data were collected as the mean fluorescence value of the cell population since data showed a normal distribution.

2.3. Spectrophotometric analyses

Lipid peroxidation, catalase activity and protein content were measured in *Chlamydomonas reinhardtii* cells.

Algae were harvested (5×10^6 cells) by centrifugation and dissolved in 800 μL phosphate buffer (50 mM) containing trichloro-acetic acid (TCA) (0.67%, w/v) in the lipid peroxidation protocol followed by cell disruption using ultra-sonication at 400 mA for 180 s. Homogenates were centrifuged and the supernatant was collected and stored at -80 °C. Total protein content of each supernatant was measured by the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad) using the Coomassie Brilliant Blue G-250 dye (absorbance was read at 600 nm) (Bradford, 1976).

2.3.1. Lipid peroxidation

Lipid peroxidation (LP) was measured as an indicator of ROS-mediated damage. Levels of lipid peroxidation products were measured as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to methods described by Heath and Packer (1968) with modifications. The method was based on the malondialdehyde (MDA) production during the oxidation of polyunsaturated fatty acids. 150 μL of supernatant was mixed with 450 μL of 0.5% thiobarbituric acid (TBA) (w/v) in 20% TCA

(w/v). The mixture was heated to 95 °C for 30 min, cooled on ice for 10 min and centrifuged at 15,000 rpm for 2 min. The absorbance of the supernatant was measured with a spectrophotometer (Eon Microplate Spectrophotometer) at 532 nm, and corrected for unspecific turbidity by subtracting the absorbance of the same sample at 600 nm. The absorbance of the blank solution (0.5% TBA and 20% TCA) was used as a zero reference. A standard curve ($R^2 = 0.99$) was prepared in duplicate from a 1,1,3,3-tetramethoxypropane solution (Sigma-Aldrich). The results were expressed as $\mu\text{M MDA}/5 \times 10^6$ cells.

2.3.2. Catalase activity

Catalase (CAT) activity in *C. reinhardtii* was adapted from Aebi (1984). 15 μL of supernatant was mixed with 95 μL of 50 mM KH_2PO_4 at pH 7.0 and 50 μL of 19 mM H_2O_2 . Absorbance was read every 40 s for 120 s at 240 nm with a spectrophotometer (EON Microplate Spectrophotometer). Finally, catalase activity was expressed as Units/ μg protein using a molar extinction coefficient of $0.0436 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.4. Fluorescence microscopy analyses

Fluorescence microscope was used to study morphology alterations related to cellular senescence or PCD in algae cells. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) was used to study changes in nuclear morphology and chromatin distribution (Darehshouri et al., 2008) and Monodansylcadaverine (MDC) (*N*-(5-Aminopentyl)-5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonamide) was used to study the presence of autophagic vacuoles inside cells (Contento et al., 2005). Control, exposed and stationary cells (5×10^6 cells) were stained with 7.2 μM of DAPI (Esperanza et al., 2015b) or 50.1 μM of MDC for 10 min at RT and then were mixed in 0.7% (w/v) low melting point agarose (LMA) to prepare the slides.

The prepared slides were subsequently examined at X400 magnification using a Nikon Eclipse E400 epifluorescence microscope (Nikon Instruments Europe BV) equipped with UV-2A filters (excitation 330–380 nm, dichroic mirror 400 nm, band pass 420 nm) to detect DAPI and MDC fluorescence emissions. One hundred cells per culture were randomly analysed (50 cells per slide), counting the number of cells affected. Results were expressed as the percentage of affected cells vs. the total amount of cells analysed. Photographs were taken with a high-definition cooled colour camera Nikon DS-5MC.

2.5. RT-qPCR

Total RNA was isolated using the RNeasy[®] Plus Mini kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. For each replicate ($n = 3$) extractions were performed with 5×10^6 cells of *C. reinhardtii*. Reverse transcription was performed with 500 ng of RNA QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The first cDNA was used as a template for qRT-PCR amplification to analyse transcript level of several genes related to oxidative stress: i.e. genes encoding ascorbate peroxidase (*APX D*), catalase (*CAT*), Mn-superoxide dismutase (*SOD-1*), glutathione peroxidase (*GPX*) and S-transferase (*GST*). Primers were retrieved from published sequences. Genes selected for this study, names, abbreviations, primer sequences, primer-specific efficiency (%) and amplicon length (bp) can be found in Table 1.

Real time PCR was performed using CFX96 Touch[™] Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) following the protocol of Sanchez et al. (2015). Each reaction was run in duplicate and consisted of 5 μL cDNA (equivalent to 5 ng cDNA), 6.5 μL iQTM SYBR[®] Green Supermix, primers (300 nM each) and DEPC treated-water up to a total volume of 13 μL . Cycling parameters were: 95 °C for 2 min, 40 cycles at 95 °C for 15 s, and 60 °C for 5 s. Amplification specificity was verified with a melting curve. No-template control (NTC) was included on each plate. Data acquisition and analysis were performed by CFX Manager[™] Software (Bio-Rad). Quantification cycle (Cq) values were used in order to

select reference genes.

Relative gene transcription was calculated using reference genes (*CBLP*, *BTUB* and *UBCX*) and the Cq values were corrected with the estimated PCR efficiency. The comparative threshold method ($\Delta\Delta\text{Ct}$) (Livak and Schmittgen, 2001) was used for relative quantification. Each reaction was run in technical triplicate and three independent biological replicates were calculated. The control samples (non-exposed microalgae) at 24 h were chosen to represent $1 \times$ transcription of the genes of interest. Treated samples were expressed relative to the corresponding control to determine the difference in transcription.

2.6. Data analyses

For data analyses mean values \pm standard deviation (SD) of experiments were calculated. Results were then expressed as a percentage of variation with respect to control at 24 h, for which a value of 100% was assigned. These data were statistically analysed by an overall one-way analysis of variance (ANOVA) using IBM SPSS Statistics software 21.0. A p -value < 0.05 was considered statistically significant. When significant differences were observed, control cultures at 24 h vs. exposed and stationary cultures means were compared using the Dunnett post hoc test ($p < 0.05$).

3. Results and discussion

3.1. Cell viability and daily growth rates

The percentage of viable cells of *C. reinhardtii* with intact plasma membrane (PI- cells) remained close to 100% in all tested conditions; no significant differences ($p > 0.05$) were detected in comparison to 24 h-control (data not shown), indicating that 0.25 μM of atrazine represents a sublethal concentration for these unicellular algae.

Regarding growth rates, results obtained in unexposed cultures showed a significant decrease ($p < 0.05$) in the 72–96 h DGR (0.55 ± 0.02) with respect to 0–24 h-control cultures (1.96 ± 0.05), suggesting that after 96 h cells enter stationary phase, probably due to the depletion of nutrients in the medium that are insufficient to support high rates of growth. Moreover, cells were affected by herbicide stress (0.25 μM of atrazine), exposed cultures showed a significant decrease ($p < 0.05$) in the 0–24 h DGR (1.66 ± 0.08) and in the 72–96 h DGR (0.40 ± 0.02) with respect to 0–24 h-control cultures.

Similar results were detected in Esperanza et al. (2015a) where growth data indicated that atrazine treatment after 24 h caused a significant ($p < 0.05$) inhibition of growth of 45.6% in *C. reinhardtii* cells. It has also been reported that other microalgal cells exposed to several concentrations of atrazine after 48 and 96 h were not able to complete their cell division but maintained their metabolic activity and cell viability (González-Barreiro et al., 2004).

3.2. Calcium signalling

Ca^{2+} is a ubiquitous intracellular second messenger in the signal transduction of environmental stimuli in plants (Sun et al., 2006). The acute exposure to atrazine caused a significant increase ($113.60 \pm 4.59\%$, $p < 0.05$) of the intracellular free Ca^{2+} levels in *C. reinhardtii* with respect to control log cultures. However, in 96 h-stationary unexposed cultures a significant decrease ($82.47 \pm 8.94\%$, $p < 0.05$) of intracellular free Ca^{2+} was observed (Fig. 2).

The increase in the cytosolic Ca^{2+} level has been previously observed in plant cells in response to different stress factors such as heat and aluminium (Gong et al., 1998; Sivaguru et al., 2005). When plants are forced to respond to environmental stimuli, the Ca^{2+} level increases rapidly and transiently in the cytoplasm as a result of either Ca^{2+} uptake from the extracellular space through the plasma membrane channels or Ca^{2+} release from internal stores, such as the endoplasmic reticulum or vacuoles (Sun et al., 2006). In this study, the fast

Table 1
Genes, abbreviation, and primers used for RT-qPCR analyses in *Chlamydomonas reinhardtii*.

Gene name	Abbreviation	Primer sequence	Efficiency (%)	Amplicon length (bp)	Reference
G protein beta subunit-like polypeptide	<i>CBLP</i>	Forward 5' GCC ACT CCC TGT AAA TGC C 3' Reverse 5' CTC CTC CTA AAC CCC TCC AG 3'	93.2	88	Sanchez et al. (2015)
Ubiquitin-conjugating enzyme E2	<i>UBCX</i>	Forward 5' ATA CAC AAC CAC GAT GAC GAT 3' Reverse 5' TTG CGT GTG TCC TCT CAT CA 3'	96.6	95	Sanchez et al. (2015)
Beta tubulin 2	<i>BTUB</i>	Forward 5' CCC CCG CCT GCA CTT CTT C 3' Reverse 5' GTC GGC GGC GCA CAT CAT 3'	94.3	133	Idoine et al. (2014)
Ascorbate peroxidase	<i>APX-1</i>	Forward 5' AGT TGT GTA GTG TGT GGC AG 3' Reverse 5' CGG TAT GAT GAT AAG GGT TCG CA 3'	103.2	100	Sanchez et al. (2015)
Catalase	<i>CAT</i>	Forward 5' CAG GAG GCT GCA GGA AAA CT 3' Reverse 5' ATG ACA ACA TGT ACA TTA CGC GG 3'	93.4	109	Sanchez et al. (2015)
Mn-superoxide dismutase	<i>SOD-1</i>	Forward 5' TGT CAG TTT TGT TTC CCT CGT 3' Reverse 5' CTT TCA TGT TCC TCG CGA GC 3'	92.3	108	Sanchez et al. (2015)
Glutathione peroxidase	<i>GPX</i>	Forward 5' CTG TTG CCG TTG TCC TGC TC 3' Reverse 5' GCC AGC CCC TAG GAT ACA AG 3'	95.1	119	Sanchez et al. (2015)
Glutathione S-transferase	<i>GST</i>	Forward 5' GCT AGC AAG GCA AAA CTC TTT 3' Reverse 5' GCG TCA CAA TGT CAA TCT GG 3'	97	106	Sanchez et al. (2015)

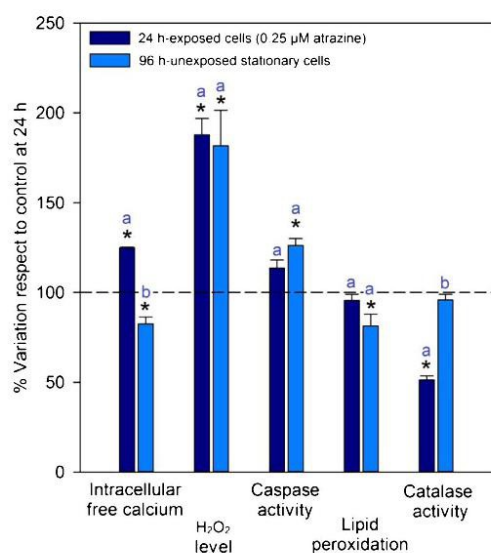


Fig. 2. Variations in intracellular free calcium and H₂O₂ levels, caspase activity, lipid peroxidation and catalase activity in *C. reinhardtii* cells exposed to 0.25 μM of atrazine for 24 and 96 h-unexposed stationary cells. Results for parameters are shown as a percentage of variation with respect to 24 h-control (for which the value of 100 was assigned, indicated by the dashed line). Significant differences with respect to 24 h-log control are represented by an asterisk (*). Different letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$) according to the Dunnett post hoc test.

significant increase in cytosolic Ca²⁺ level in cells acutely exposed to atrazine could indicate that this ion acts as a messenger in response to chemical stress. The fact that Ca²⁺ level raises rapidly and transiently could explain the results obtained in unexposed stationary cultures where analyses were realized after 96 h (Fig. 2). Several studies showed an increase in intracellular free Ca²⁺ levels in microalgae in response to different stress factors, i.e., nitrogen starvation, triclosan and paraquat (Chen et al., 2014; González-Pleiter et al., 2017; Prado et al., 2012b). Since the role of Ca²⁺ as a secondary messenger in the cell response to oxidative stress has been suggested (Price et al., 1994), intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) were studied in both experimental treatments with respect to control log cultures.

3.3. ROS overproduction and changes in lipid peroxidation

In order to investigate the effects of atrazine and depletion of nutrients in the culture medium on a potential oxidative stress of *C. reinhardtii*, FCM analyses of intracellular ROS generation was evaluated. Results obtained showed a significant increase ($p < 0.05$) in the intracellular level of hydrogen peroxide (H₂O₂) in cultures acutely exposed to the chemical ($187.83 \pm 8.99\%$) and in 96 h-unexposed cultures ($181.75 \pm 19.73\%$) with respect to 24 h-log control cultures (Fig. 2). Data showed similar levels of impact on this oxidative stress marker for both treatments groups (Fig. 2), indicating that the production of ROS may be a common action mechanism between atrazine toxicity stress in exposed cultures and starving stress in stationary cultures.

In fact, there is considerable evidence that oxidative stress plays a role in plant senescence (Sohal, 2002). It has been hypothesised that an imbalance between ROS generation, antioxidant protection and repair of oxidative damage may lead to senescence (Beckman and Ames, 1998).

In the present study, an accumulation of ROS was detected in *C. reinhardtii* cells caused by atrazine exposure (Fig. 2). Several ecotoxicological studies have also reported ROS formation in unicellular algae exposed to atrazine (Esperanza et al., 2016; Qian et al., 2009; Mofeed and Mosleh, 2013), paraquat (Esperanza et al., 2015b; Jammers et al., 2009; Nestler et al., 2012; Prado et al., 2012a, 2012b), and metals (Melegari et al., 2013; Perreault et al., 2012).

In algae, the excess ROS content may affect many cellular functions through modification of nucleic acids, oxidation of proteins, deterioration of chlorophyll, and induction of lipid peroxidation (Ledford and Niyogi, 2005; Mittler et al., 2004; Vavilala et al., 2016). Particularly, MDA is one of the several low-molecular-weight end products formed by the decomposition of primary hydroperoxides and lipid polymers (Gill and Tuteja, 2010). Measurement of MDA level is routinely used as an index of lipid peroxidation in algae, and has been documented to vary in the algae *C. pyrenoidosa* under many stressful conditions such as high temperatures (Vavilin et al., 1998), exposure to wide range of trace elements in the alga *P. viridis* (Li et al., 2006), exposure to organic pollutants in the alga *E. gracilis* (Li et al., 2009) and in *C. reinhardtii* (Elbaz et al., 2010; Sanchez et al., 2015). Contrary to expectations, the levels of MDA decreased in acutely exposed cultures and in 96 h-unexposed stationary cultures ($95.57 \pm 3.31\%$, $81.23 \pm 6.64\%$, respectively). These differences are significant ($p < 0.05$) only in stationary cultures (Fig. 2). No significant differences ($p > 0.05$) were detected in algae acutely exposed and stationary cells, showing similar levels of MDA (Fig. 2). MDA results did not indicate lipid peroxidation in algal cell membranes after exposure

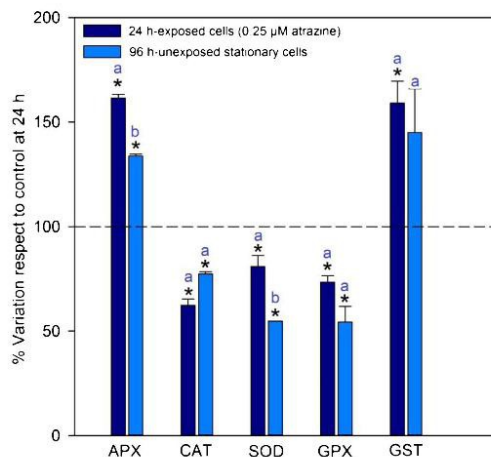


Fig. 3. Relative genes transcription levels measured by RT-qPCR in *C. reinhardtii* cells exposed to 0.25 μM of atrazine for 24 and 96 h-stationary cultures. Results are shown as percentage of variation of transcription of genes encoding ascorbate peroxidase (APX I), catalase (CAT), Mn-superoxide dismutase (SOD-1), glutathione peroxidase (GPX) and S-transferase (GST) with respect to 24-h-log control (for which a value of 100 is assigned, indicated by the dashed line). Significant differences ($p < 0.05$) are represented by an asterisk (*). Different letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$) according to the Dunnett post hoc test.

to atrazine or in 96 h-stationary cultures but FCM analysis showed an increase of ROS for these two treatments (Fig. 2). Although the measurement of functional responses of individual cells by FCM is more sensitive than bulk analyses using spectrophotometry, this absence of lipid peroxidation may also suggest the activation of antioxidant enzymes.

3.4. Activation of antioxidant enzyme system

The overproduction of ROS in cells is often related to unspecific damages of cellular components, leading to a disruption of crucial metabolic processes (Mittler, 2002; Vega et al., 2006). To prevent metabolism disruption, the cell activates a set of protective mechanisms. Among them, the induction of antioxidative enzymes plays a prominent role (Mittler, 2002; Pokora and Tukaj, 2010). The transcriptional response of oxidative stress-related genes (Table 1) was measured using RT-qPCR.

Based on this, gene expression analyses indicated a similar pattern of response in 96 h-stationary cultures and in cultures exposed to atrazine for 24 h. Results showed a significant ($p < 0.05$) up-regulation of the transcription of APX and GST compared to control (Fig. 3); however, the levels CAT, SOD and GPX transcripts were significantly ($p < 0.05$) decreased in both cases (Fig. 3).

In higher plants, CAT and APX I are considered the most important enzymes that can regulate the intracellular hydrogen peroxide levels i.e., transformation of H_2O_2 to H_2O (Livingstone, 2001; Nakano and Asada, 1981). In the present study, the transcription of APX I was significantly increased in 96 h-stationary and 24 h-exposed cells ($133.75 \pm 0.89\%$, $161.51 \pm 1.78\%$, respectively) (Fig. 3), whereas the transcription of CAT significantly decreased ($77.23 \pm 1.11\%$ and $62.30 \pm 2.96\%$ in stationary cells at 96 h and in exposed cultures at 24 h, respectively) (Fig. 3). These results correlated well with spectrophotometric analyses where a decrease in CAT activity was observed in 96 h-stationary and in 24 h-exposed cultures ($95.69 \pm 3.23\%$, $51.26 \pm 2.24\%$, respectively). However, this decrease was only significant ($p < 0.05$) in 24 h-exposed cells (Fig. 2). CAT is mainly

located in the peroxisome and is responsible for the protection from the oxidation of unsaturated fatty acids in cell membrane. APX I is an enzyme involved in the ascorbate-glutathione cycle in the chloroplast, mitochondria as well as in peroxisomes (del Río et al., 2006). High level of endogenous ascorbate peroxidase is essential to maintain the antioxidant system that protects plants from oxidative damage from biotic and abiotic stresses (Shigeoka et al., 2002).

GPX, GST and SOD are primary enzymes involved in the cell antioxidant defence system. The biochemical function of GPX is to reduce lipid hydro-peroxides to their corresponding alcohols (OH^-), and to reduce free H_2O_2 to H_2O (Epp et al., 1983). GST is best known for its ability to bind toxins and its function as transport proteins (Udomsinprasert et al., 2005) is important for the detoxification process inside the cells. In the present study, an increase in the relative transcript abundance of GST was observed in 96 h-stationary cultures and in cultures exposed to atrazine for 24 h (144.97 ± 20.88 , $159.10 \pm 10.44\%$, respectively). However, a significant decrease was observed in the relative transcript abundance of GPX, $54.26 \pm 7.52\%$ in 24 h-exposed cultures and $73.40 \pm 3.01\%$ in 96 h-stationary cultures and SOD, $80.85 \pm 5.28\%$ in 24 h-exposed cultures and $54.73 \pm 0.01\%$ in 96 h-stationary cultures (Fig. 3). Within cells, SOD constitutes the first line of defence that catalyses the reaction of disproportionation of superoxide (O_2^-) into O_2 and H_2O_2 (McCord and Fridovich, 1988) that is further scavenged by catalases and peroxidases (Aksmann et al., 2014; Asada, 2006). The activities of SOD, CAT and APX are mutually closely dependent due to the fact that the product of SOD-catalysed reaction becomes a substrate for APX and CAT.

Contrary to expectations SOD relative transcript abundance was decreased while H_2O_2 production was increased in both treatments (Fig. 2). There are potential explanations to this. Firstly, the superoxide dismutase family of metalloisozymes are differentiated by their metal cofactor, 3 isoforms common to plants (CuZn-SOD, Fe-SOD, and Mn-SOD) have been found in microalgae (Janknegt et al., 2009; Kanematsu et al., 2010; Zbigniew and Wojciech 2006). In this work, transcription of one form of these superoxide dismutases (Mn-superoxide dismutase) was analysed and a decrease was observed after both experimental treatments but the other forms could be up-expressed and this may explain the ROS overproduction (Fig. 2). Moreover, an increase in intracellular ROS levels is not always related to an up-expression of antioxidant related-genes. For example, González-Pleiter et al. (2017) and Sanchez et al. (2015) observed an increase in ROS production in cells of *C. reinhardtii* exposed to triclosan and C10-PFPA, respectively; however SOD activity was also downregulated in both studies. Janknegt et al. (2009) also found a decrease SOD activity in some microalgae species in response to high-irradiance. In other studies, copper did not alter SOD activity in *C. kessleri* (Sabatini et al., 2009), nor did zinc in *P. viridis* (Li et al., 2006), nor did chlorine in *C. ehrenbergii* (Sathasivam et al., 2016). Furthermore, there are more mechanisms of H_2O_2 production. Esperanza et al. (2015a) suggested that photosynthesis inhibition in *C. reinhardtii* by atrazine leads cells to get energy through a heterotrophic metabolism to maintain their viability. This change in metabolism could provoke an increase in photorespiration rate, leading to the production of hydrogen peroxide in microalgal peroxisomes (Cirulis et al., 2013).

The modification of the expression of antioxidant related-genes observed, either increase in GST and APX I or decrease in CAT, GPX and SOD-I (Fig. 3), suggest a versatile and flexible antioxidant system that tries to control the optimum ROS levels, but in this work a failure in the cell detoxification system was observed, since an overproduction of intracellular ROS was detected in both treatments, herbicide exposure and nutrient deprivation (Fig. 2). Moreover, the transcription of a gene must be reflected in translational changes in order to ultimately lead to functional protein products (Sanchez et al., 2015). Investigating such changes in translation are required in future studies in order to better understand the antioxidant response in microalgae.

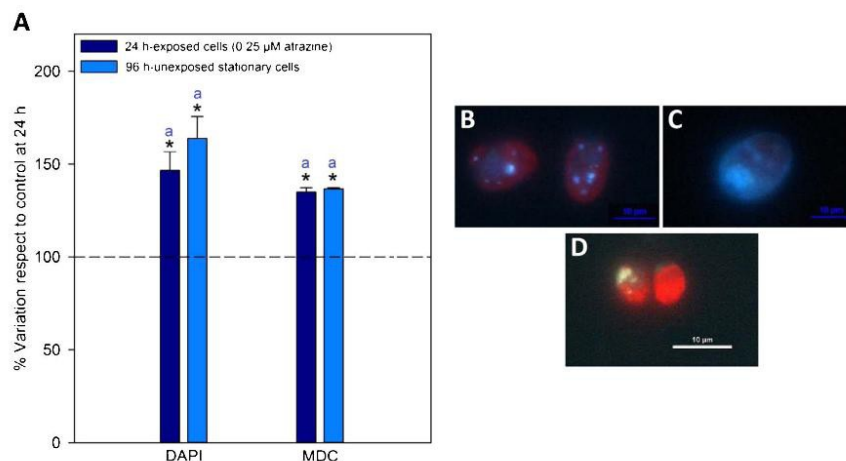


Fig. 4. Cell alterations evaluated in *C. reinhardtii* cells in 24 h log control cultures, 24 h exposed cultures to 0.25 µM of atrazine and 96 h-stationary cultures. (A) Chromatin alterations or nuclear morphological alterations and presence of autophagic vacuoles, evaluated by DAPI and MDC stainings, respectively, using epifluorescence microscopy. Results are shown as percentage of variation of DAPI-positive and MDC-positive with respect to 24 h-control (for which a value of 100 is assigned, indicated by the dashed line). Significant differences ($p < 0.05$) are represented by an asterisk (*). Different letters indicate significant differences between treatments at the level of 0.05 ($p < 0.05$) according to the Dunnett post hoc test. Representative pictures were taken with a high-definition cooled colour camera Nikon DS-5Mc at $\times 1000$ magnification, (B) DAPI-negative cell and (C) DAPI-positive cell and (D) MDC-negative (the left cell) and MDC-positive (the right cell).

3.5. Caspase activity and other hallmarks of PCD

Programmed cell death (PCD) is a cellular process that can occur in response to various biotic or abiotic stresses. PCD may be of high ecological relevance in a unicellular alga, as it may guarantee survival of the population under unfavourable environmental conditions (Darehshouri et al., 2008). Several PCD processes are mediated by a set of enzymes called caspases that have the unusual characteristic of cleaving peptide chains after aspartate residue. Caspase-dependent PCD is regulated by two pathways (Elmore, 2007). These include the extrinsic ‘death-receptor-mediated’ and an intrinsic ‘mitochondrion-mediated’ pathway. These pathways converge with caspase activation. In this study, a significant ($p < 0.05$) increase in the caspase activity was observed in 24 h-exposed and 96 h-stationary cultures ($113.60 \pm 4.59\%$, $126.23 \pm 3.85\%$, respectively) (Fig. 2). These enzymes are involved in the activation of a caspase activated DNase and subsequently, it generates the classical oligonucleosomal DNA ladder (Sprick and Walczak 2004).

Based on this, cells were analysed by DAPI staining to study the DNA damage in *C. reinhardtii* nuclei. A significantly increased number ($p < 0.05$) of DAPI-positive (Fig. 4c) cells with intense fluorescence stained nuclei were observed in both treatments compared to 24 h-log control (Fig. 4a). The percentage of DAPI-positive cells reached $146.60 \pm 10.10\%$ and $163.79 \pm 11.77\%$ in ATZ-exposed cultures at 24 h and in stationary cultures at 96 h, respectively, with similar levels of response (Fig. 4a) as compared to control algae. Obtained results showed the activation of caspase cascade (Fig. 2) that may be related to the morphological changes displayed in the nuclei of *C. reinhardtii* cells (Fig. 4a) with regard to control cultures.

Moreover, to study the potential presence of autophagic vacuoles, cells were analysed by MDC staining, a fluorescent dye that specifically stains auto-phagosomes (Contento et al., 2005; Xiong et al., 2007). A significantly increased ($p < 0.05$) number of MDC-positive cells were observed in algae exposed for a short period to atrazine and in unexposed cells after 96 h (Fig. 4a). The percentage of MDC-positive cells reached $134.97 \pm 2.31\%$ and $136.70 \pm 0.57\%$ in exposed cultures at 24 h and in control cultures at 96 h, respectively compared to 24-h

control cultures (Fig. 4a). No significant differences ($pn > 0.05$) were detected between treated cultures in DAPI and MDC analyses (Fig. 4a); cells exposed to both treatments (chemical stress and depletion of nutrients) were suffering the same level of alteration. In summary, results suggest an activation of the caspase cascade (Fig. 2), DNA damage in *C. reinhardtii* nuclei and auto-phagosomes in atrazine exposed cells (Fig. 4). These senescence-related parameters were also detected in cells in 96 h-stationary cultures (Figs. 2 and 4). This suggests that a short-term exposure to atrazine provoked a cellular senescence in *C. reinhardtii*, since both treatments have suffered same type and level of alteration.

Regarding DAPI-positive cells, several authors have related these changes in nuclear morphology in plants and microalgae to chromatin condensation, which is frequently described as an apoptotic endpoint (Darehshouri et al., 2008; Elmore, 2007; Ferradás et al., 2014; Giri et al., 2013; Jimenez et al., 2009; Zuppin et al., 2009, 2010). In accordance to this, *C. reinhardtii* cells exposed to atrazine for 24 h and unexposed stationary cells at 96 h presented irregular DAPI staining as well as a slight degree of chromatin clumping in their nuclei (Fig. 4c). Since DAPI can stoichiometrically bind to DNA, an increase of dye fluorescence could exclusively be related to the different DNA content in the cells. However, in DAPI-positive cells (Fig. 4c), chromatin aggregation was not only restricted to the nuclear area, with blue-stained granules also observed in the center of the cell. These observations suggest some degree of karyolysis (Jiménez et al., 2009). Esperanza et al. (2015b) observed that a known prooxidant herbicide (paraquat) also provoked similar nuclear morphological alterations in (DAPI-positive) cells in *C. reinhardtii*, supporting again the central role of ROS generation as a trigger of the PCD-related alterations reported in aged cells in this work.

Autophagy has been associated with cell death phenomena. But also as a catabolic process, autophagy allows eukaryotic cells to recycle intra-cellular components including entire organelles during development or under stress conditions such as nutrient limitation (He and Klionsky, 2009; Liu and Bassham, 2012; Mizushima et al., 2011). In addition to recycling, autophagy is required for the degradation of damaged or toxic material that can be generated as a result of ROS

accumulation during oxidative stress (Pérez-Pérez et al., 2012). The treatment of *C. reinhardtii* cells with H₂O₂ or methylviologen results in autophagy activation (Pérez-Pérez et al., 2010, 2012). Interestingly in this study, a decrease in lipid peroxidation was observed (Fig. 2). These data could be related to the presence of autophagic vacuoles that would recycle damaged material, such as altered lipids in microalgal membrane. This could explain the absence of damage in plasma membrane observed in this work reported by PI analyses using FCM. Several authors used MDC staining to investigate the presence of autophagosomes in *Arabidopsis* cells (Contento et al., 2005; Xiong et al., 2007). However, this is the first study, to the authors' knowledge, to use MDC staining in microalgae.

Overlaps between the processes of PCD are detected in this study, such as caspase activity, typical hallmark of apoptosis and autophagosomes, typical of autophagy. Several studies have claimed that the two are fully synchronous and finally proceed towards death (van Doorn and Woltering, 2004). In recent years, many researchers have indicated the occurrence of PCD in unicellular algae (Franklin et al., 2006; Pérez-Pérez et al., 2010, 2012), such as *C. reinhardtii*, exposed to various stimuli, i.e. acetic acid (Zuo et al., 2012), ultraviolet light C (UV-C) radiation (Moharikar et al., 2006, 2007), heat (Durand et al., 2011; Nedelcu, 2006) and mastoparan (Yordanova et al., 2013).

As commented before, the use of senescence in microalgal work is problematic since the process of growing old is difficult to define in unicellular organisms. Senescence has often been used to refer to the appearance of cells after exponential growth, i.e. when many cells are probably dead due to natural cell death (Franklin et al., 2006). In the present work, the occurrence of several PCD hallmarks is reported in *C. reinhardtii* cells after a short-term exposure to atrazine as well as in nutrient-deprived cells. In this sense, algal senescence could be functionally equivalent to multicellular plant senescence (which is controlled via PCD) with protease expression and cellular dissolution occurring in order to fulfil a functional role in natural populations (Franklin et al., 2006).

4. Conclusions

In the present study, the response of the freshwater microalga *C. reinhardtii* exposed to a sublethal concentration of the herbicide atrazine (0.25 µM) for 24 h and in 96 h-unexposed stationary cultures was studied to investigate the effect of a chemical (herbicide) and nutrient deprivation on several senescence-related parameters.

Results of intracellular levels of calcium suggest that this ion can act as a transitory messenger in the signal transduction of *C. reinhardtii* cells exposed to stress conditions, since an increase was detected after short-term exposure to atrazine. Both experimental treatments provoke an increment in ROS generation, suggesting that the common action mechanism between both treatments (chemical and starvation) may be oxidative stress. Moreover, the modification of the expression of antioxidant related-genes observed in this work, either increase in *GST* and *APX I* or decrease in *CAT*, *GPX* and *SOD-1* (Fig. 3), suggest a versatile and flexible antioxidant system in response to ROS overproduction. This intracellular increment of ROS levels could be related to the occurrence of typical PCD hallmarks in both experimental treatments. Unexposed cultures in stationary phase showed an activation of caspase cascade, as well as nuclear morphological alterations and autophagosomes in *C. reinhardtii* cells, indicating cellular senescence in these cultures. These senescence characteristics with a similar level of alteration with a similar level of alteration also appear in cultures exposed to atrazine. Finally, the decrease observed in lipid peroxidation in both treatments could be also related to the increment of autophagic vacuoles that recycle damaged material, such as altered lipids in microalgal membranes.

Microalgae are known to be sensitive to chemicals and, because of their short life cycle, often provide one of the first signals of ecosystem impacts. Their primary production and their essential roles in nitrogen

and phosphorus cycling are critical to aquatic ecosystems. Molecular and cellular alterations reported in the present work suggest that exposure to chemical substances, such as atrazine, induces ROS overproduction leading to the occurrence of cellular senescence alterations in the microalgal populations, potentially compromising biodiversity, structure and function of higher trophic levels in freshwater ecosystems.

Acknowledgements

This work was carried out with the financial support of the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (CGL2010-15993/BOS). M. E. and M. S. acknowledge a pre-doctoral fellowship from the Xunta de Galicia (Spain). M. E. also acknowledges a pre-doctoral grant from the "Fundación Barrié".

Authors wish to thank David Sanchez, Guillaume Cottin, Mélanie Douville, Maxime Dubé and Romy Técher (Environment and Climate Change Canada) for their help during the course of this project.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Aksmann, A., Pokora, W., Baścik-Remisiewicz, A., Dettlaff-Pokora, A., Wielgomas, B., Dziadziuszko, M., Tukaj, Z., 2014. Time-dependent changes in antioxidant enzyme expression and photosynthetic activity of *Chlamydomonas reinhardtii* cells under acute exposure to cadmium and anthracene. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 110, 31–40.
- Asada, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141, 391–396.
- Bahadar, H., Abdollahi, M., Maqbool, F., Baeri, M., Niaz, K., 2014. Mechanistic overview of immune modulatory effects of environmental toxicants. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 13, 382–386.
- Beckman, K.B., Ames, B.N., 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78, 547–581.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Campisi, J., 2007. Aging and cancer cell biology. *Aging Cell* 6, 261–263.
- Chen, H., Zhang, Y., He, C., Wang, Q., 2014. Ca²⁺ signal transduction related to neutral lipid synthesis in an oil-producing green alga *Chlorella* sp. C2. *Plant Cell Physiol.* 55, 634–644.
- Choi, C.J., Berges, J.A., Young, E.B., 2012. Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll a fluorescence: variable responses among freshwater microalgae. *Water Res.* 46, 2615–2626.
- Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C., Abalde, J., 1996. Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry. *Cytometry* 25, 32–36.
- Cirulis, J.T., Scott, J.A., Ross, G.M., 2013. Management of oxidative stress by microalgae. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 91, 15–21.
- Contento, A.L., Xiong, Y., Bassham, D.C., 2005. Visualization of autophagy in *Arabidopsis* using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AT1G78e fusion protein. *Plant J.* 42, 598–608.
- Danon, A., Delorme, V., Mailhac, N., Gallois, P., 2000. Plant programmed cell death: a common way to die. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 647–655.
- Darehshouri, A., Affenzeller, M., Lütz-Meindl, U., 2008. Cell death upon H₂O₂(2) induction in the unicellular green alga *Microcystis*. *Plant Biol.* 10, 732–745.
- Didur, O., Perreault, F., Ouakroum, A., Dewez, D., Popovic, R., 2012. Alteration of photosystem II activity by atrazine on *Chlamydomonas reinhardtii* synchronized and asynchronous cell cycle cultures. *Toxicol. Environ. Chem.* 94, 906–917.
- Durand, P.M., Rashidi, A., Michod, R.E., 2011. How an organism dies affects the fitness of its neighbors. *Am. Nat.* 177, 224–232.
- Elbaz, A., Wei, Y.Y., Meng, Q., Zheng, Q., Yang, Z.M., 2010. Mercury-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology* 19, 1285–1293.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.
- Epp, O., Ladenstein, R., Wendel, A., 1983. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur. J. Biochem.* 133, 51–69.
- Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2015a. *Chlamydomonas reinhardtii* cells adjust the metabolism to maintain viability in response to atrazine stress. *Aquat. Toxicol.* 165, 64–72.
- Esperanza, M., Cid, Á., Herrero, C., Rioboo, C., 2015b. Acute effects of a prooxidant herbicide on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: Screening cytotoxicity and genotoxicity endpoints. *Aquat. Toxicol.* 165, 210–221.
- Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2016. Early alterations on photosynthesis-related parameters in *Chlamydomonas reinhardtii* cells exposed to atrazine: a multiple approach study. *Sci. Total Environ.* 554–555, 237–245.
- European Commission (SANCO/10496/2003-final), 2003. Review Report for the Active Substance Atrazine.
- Fernández-Naveira, A., Rioboo, C., Cid, Á., Herrero, C., 2016. Atrazine induced changes in elemental and biochemical composition and nitrate reductase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Phycol.* 51, 338–345.

- Ferradás, Y., López, M., Rey, M., González, M.V., 2014. Programmed cell death in kiwi-fruit stigmatic arms and its relationship to the effective pollination period and the progamic phase. *Ann. Bot.* 114, 35–45.
- Fogg, G.E., Thake, B., 1987. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. The University of Wisconsin press, Madison, WI 269 pp.
- Franklin, D.J., Berges, J.A., 2004. Mortality in cultures of the dinoflagellate *Amphidinium carterae* during culture senescence and darkness. *Proc. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* B 271, 2099–2107.
- Franklin, D.J., Brussaard, C.P.D., Berges, J.A., 2006. What is the role and nature of programmed cell death in phytoplankton ecology? *Eur. J. Phycol.* 41, 1–14.
- Fredriksson, A., Nyström, T., 2006. Conditional and replicative senescence in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 612–618.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.
- Giri, B.R., Roy, B., Sinha-Babu, S.P., 2013. Evidence of apoptosis in *Raillietina echinobothrida* induced by methanolic extracts of three traditional medicinal plants of Northeast India. *Exp. Parasitol.* 134, 466–473.
- Gong, M., van der Luit, A., Knight, M.R., Trewwas, A.J., 1998. Heat-shock-induced changes in intracellular Ca^{+2} level in tobacco seedlings in relation to thermo-tolerance. *Plant Physiol.* 116, 429–437.
- González-Barreiro, O., Rioboo, C., Gid, A., Herrero, C., 2004. Atrazine-induced chlorosis in *Synechococcus elongatus* cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 301–307.
- González-Pleiter, M., Rioboo, C., Reguera, M., Abreu, I., Leganés, F., Gid, A., Fernández-Piñas, F., 2017. Calcium mediates the cellular response of *Chlamydomonas reinhardtii* to the emerging aquatic pollutant Triclosan. *Aquat. Toxicol.* 186, 50–66.
- Harris, E.H., 1989. *The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*. Academic Press, San Diego.
- Harris, E.H., 2001. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 363–406.
- He, C., Klionsky, D.J., 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43, 67–93.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: i. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189–198.
- Hoebrechts, J.A., Woltering, E.J., 2003. Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays* 25, 47–57.
- Humby, P.L., Snyder, E.C.R., Durnford, D.G., 2013. Conditional senescence in chlamydomonas reinhardtii (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 49, 389–400.
- Idoine, A.D., Boulouis, A., Rupprecht, J., Bock, R., 2014. The diurnal logic of the expression of the chloroplast genome in chlamydomonas reinhardtii. *PLoS One* 9, e108760.
- Jamers, A., Blust, R., De Coen, W., 2009. Omics in algae: paving the way for a systems biology understanding of algal stress phenomena? *Aquat. Toxicol.* 92, 114–121.
- Janknegt, P.J., De Graaff, C.M., Van De Poll, W.H., Visser, R.J.W., Rijstenbil, J.W., Buma, A.G.J., 2009. Short-term antioxidative responses of 15 microalgae exposed to excessive irradiance including ultraviolet radiation. *Eur. J. Phycol.* 44, 525–539.
- Jimenez, C., Capasso, J.M., Edelstein, C.L., Rivard, C.J., Lucia, S., Brusegemma, S., Berl, T., Segovia, M., 2009. Different ways to die: cell death modes of the unicellular chlorophyte *Dunaliella viridis* exposed to various environmental stresses are mediated by the caspase-like activity DEVase. *J. Exp. Bot.* 60, 815–828.
- Kanematsu, S., Iriguchi, M., Ienaga, A., 2010. Characterization of CuZn-superoxide dismutase gene from the green alga *Spirogyra* sp. (Streptophyta) Evolutionary implications for the origin of the chloroplastic and cytosolic isoforms. *Bull. Minamikyushu Univ.* 40, 65–77.
- Ledford, H.K., Niyogi, K.K., 2005. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant Cell Environ.* 28, 1037–1045.
- Li, M., Hu, C., Zhu, Q., Chen, L., Kong, Z., Liu, Z., 2006. Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Favovella viridis* (Prymnesiophyceae). *Chemosphere* 62, 565–572.
- Liu, Y., Bassham, D.C., 2012. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 215–237.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25, 402–408.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–666.
- Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G., 2009. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ. Pollut.* 157, 561–568.
- Lorente, C., Causapé, J., Glud, R.N., Hancke, K., Merchán, D., Muñiz, S., Val, J., Navarro, E., 2014. Impacts of agricultural irrigation on nearby freshwater ecosystems: the seasonal influence of triazine herbicides in benthic algal communities. *Sci. Total Environ.* 503–504, 151–158.
- Ma, J., Xu, L., Wang, S., Zheng, W., Jin, S., Huang, S., Huang, Y., 2006. Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51, 128–132.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1988. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968–1988). *Free Radic. Biol. Med.* 5, 363–369.
- Melegari, S.P., Perreault, F., Costa, R.H.R., Popovic, R., Matias, W.G., 2013. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 142–143, 431–440.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Marechal-Drouard, L., et al., 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318, 245–250.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van, B.F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9, 490–498.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 27, 107–132.
- Mofeed, J., Mosleh, Y.Y., 2013. Toxic responses and antioxidative enzymes activity of *Scenedesmus obliquus* exposed to fenhexamid and atrazine: alone and in mixture. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 95, 234–240.
- Moharikar, S., Souza, J.S.D., Kulkarni, A.B., Rao, B.J., 2006. Apoptotic-like cell death pathway is induced in unicellular chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) cells following uv irradiation: detection and functional analyses. *J. Phycol.* 42, 423–433.
- Moharikar, S., D'Souza, J.S., Rao, B.J., 2007. A homologue of the defender against the apoptotic death gene (dad1) in UV-exposed *Chlamydomonas* cells is downregulated with the onset of programmed cell death. *J. Biosci.* 32, 261–270.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867–880.
- Nedelcu, A.M., 2006. Evidence for p53-like-mediated stress responses in green algae. *FEBS Lett.* 580, 3013–3017.
- Nestler, H., Groh, K.J., Schönenberger, R., Behra, R., Schirmer, K., Eggen, R.L.L., Suter, M.J.F., 2012. Multiple-endpoint assay provides a detailed mechanistic view of responses to herbicide exposure in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 110–111, 214–224.
- Pérez-Pérez, M.E., Florencio, F.J., Crespo, J.L., 2010. Inhibition of TOR signalling and stress activate autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 152, 1874–1888.
- Pérez-Pérez, M.E., Lemaire, S.D., Crespo, J.L., 2012. Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae. *Plant Physiol.* 160, 156–164.
- Perreault, F., Ouakroum, A., Melegari, S.P., Matias, W.G., Popovic, R., 2012. Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere* 87, 1388–1394.
- Pokora, W., Tuka, Z., 2010. The combined effect of anthracene and cadmium on photosynthetic activity of three *Desmodesmus* (Chlorophyta) species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1207–1213.
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Abalde, J., Gid, A., 2009. Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in microalgae exposed to the herbicide paraquat. *Environ. Int.* 35, 240–247.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Suarez-Bregua, P., Gid, A., 2012a. Flow cytometric analysis to evaluate physiological alterations in herbicide-exposed *Chlamydomonas moenwusii* cells. *Ecotoxicology* 21, 409–420.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Gid, A., 2012b. Screening acute cytotoxicity biomarkers using a microalga as test organism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 86, 219–226.
- Price, A.H., Taylor, A., Ripley, S.J., Griffiths, A., Trewwas, A.J., Knight, M.R., 1994. Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* 6, 1301–1310.
- Qian, H., Chen, W., Li, J., Wang, J., Zhou, Z., Liu, W., Fu, Z., 2009. The effect of exogenous nitric oxide on alleviating herbicide damage in *Chlorella vulgaris*. *Aquat. Toxicol.* 92, 250–257.
- Rutherford, A.W., Krieger-Liszka, A., 2001. Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends Biochem. Sci.* 6, 649–653.
- Sabatini, S.E., Juárez, A.B., Eppis, M.R., Bianchi, L., Luquet, C.M., Ríos de Molina, M.C., 2009. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1200–1206.
- Sanchez-Silveira, J.E., Myaki Pedrosa, D.M., 2014. UV light and skin aging. *Rev. Environ. Health* 29, 243–254.
- Sanchez, D., Houde, M., Douville, M., De Silva, A.O., Spencer, C., Verreault, J., 2015. Transcriptional and cellular responses of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* to perfluoroalkyl phosphonic acids. *Aquat. Toxicol.* 160, 31–38.
- Sathasivam, R., Ebenezer, V., Guo, R., Ki, J.S., 2016. Physiological and biochemical responses of the freshwater green algae *Clostridium elvrenbergii* to the common disinfectant chlorine. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 133, 501–508.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K., 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* 53, 1305–1319.
- Sivaguru, M., Yamamoto, Y., Rengel, Z., Ahn, S.J., Matsumoto, H., 2005. Early events responsible for aluminium toxicity symptoms in suspension-cultured tobacco cells. *New Phytol.* 165, 99–109.
- Sjollema, S.B., Martínez García, G., van der Geest, H.G., Kraak, M.H.S., Booij, P., Vethaak, A.D., Admiraal, W., 2014. Hazard and risk of herbicides for marine microalgae. *Environ. Pollut.* 187, 106–111.
- Sohal, R.S., 2002. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 37–44.
- Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Acquaviva, R., Barbagallo, I., Bognanno, M., Galvano, F., 2013. Toxicity of ochratoxin a and its modulation by antioxidants: a review. *Toxins* 5, 1742–1766.
- Sprick, M.R., Walczak, H., 2004. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1644, 125–132.
- Sun, Q.P., Guo, Y., Sun, Y., Sun, D.Y., Wang, X.J., 2006. Influx of extracellular Ca^{2+} involved in jasmonic-acid-induced elevation of $[Ca^{2+}]_{cyt}$ and JRI expression in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* 119, 343–350.
- Environmental Protection Agency, U.S., 2012. Guidelines for Water Reuse. In: EPA/600/R-12/618. EPA, U.S.
- Udamsinprasert, R., Pongjaroenkit, S., Wongsantichon, J., Oakley, A.J., Prapanthadara, L., Wilce, M.C.J., Ketterman, A.J., 2005. Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme. *Biochem. J.* 388, 763–771.
- Van Heemst, D., den Reijer, P.M., Westendorp, R.G.J., 2007. Ageing or cancer: a review. On role of caretakers and gatekeepers. *Eur. J. Cancer* 43, 2144–2152.
- Vavilala, S.L., Sinha, M., Gawde, K.K., Shirolikar, S.M., D'Souza, J.S., 2016. KCl induces a caspase-independent programmed cell death in the unicellular green chlorophyte

- Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). Phycologia 55, 378–392.
- Vavilin, D.V., Ducruet, J.M., Matorin, D.N., Venediktov, P.S., Rubin, A.B., 1998. Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. J. Photochem. Photobiol. 42, 233–239.
- Vega, J.M., Garbayo, I., Domínguez, M.J., Vígara, J., 2006. Effect of abiotic stress on photosynthesis and respiration in *Chlamydomonas reinhardtii*: Induction of oxidative stress. Enzyme Microb. Technol. 40, 163–167.
- Vicencio, J.M., Galluzzi, L., Tajeddine, N., Ortiz, C., Criollo, A., Tasdemir, E., Morselli, E., Younes, A.B., Maiuri, M.C., Lavendero, S., Kroemer, G., 2008. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path, a mini-review. Gerontology 54, 92–99.
- Wanner, U., Egli, T., 1990. Dynamics of microbial-growth and cell composition in batch culture. FEMS Microbiol. Rev. 75, 19–44.
- Weiner, A.J., Delorenzo, M.E., Fulton, M.H., 2004. Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. Aquat. Toxicol. 68, 121–128.
- White, E., Lowe, S.W., 2009. Eating to exit: autophagy-enabled senescence revealed. Genes Dev. 23, 784–787.
- Xiong, Y., Contento, A.L., Nguyen, P.Q., Bassham, D.C., 2007. Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 143, 291–299.
- Yordanova, Z.P., Woltering, E.J., Kapchina-Toteva, V.M., Iakimova, E.T., 2013. Mastoparan-induced programmed cell death in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Ann. Bot. 111, 191–205.
- Zbigniew, T., Wojciech, P., 2006. Individual and combined effect of anthracene cadmium, and chloridazone on growth and activity of SOD isoforms in three *Scenedesmus* species. Ecotoxicol. Environ. Saf. 65, 323–331.
- Zhang, L., Long, L., Zhang, W., Du, D., Lin, Y., 2012. Study of inhibition, reactivation and aging processes of pesticides using graphene nanosheets/gold nanoparticles-based acetylcholinesterase biosensor. Electroanalysis 24, 1745–1750.
- Zuo, Z.J., Zhu, Y.R., Bai, Y.L., Wang, Y., 2012. Acetic acid-induced programmed cell death and release of volatile organic compounds in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. Biochem. 51, 175–184.
- Zuppini, A., Gerotto, C., Moscatello, R., Bergantino, E., Baldan, B., 2009. *Chlorella saccharophila* cytochrome f and its involvement in the heat shock response. J. Exp. Bot. 60, 4189–4200.
- del Río, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M., Barroso, J.B., 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes production, scavenging, and role in cell signaling. Plant Physiol. 141, 330–335.
- van Doorn, W.G., Woltering, E.J., 2004. Senescence and programmed cell death: substance or semantics? J. Exp. Bot. 55, 2147–2153.
- Zuppini, A., Gerotto, C., Baldan, B., 2010. Programmed cell death and adaptation: two different types of abiotic stress response in a unicellular chlorophyte. Plant Cell Physiol. 51, 884–895.

5. *Discusión*

Toxicidad ejercida por
contaminantes acuáticos sobre
microalgas de agua dulce



La agricultura es una actividad antropológica que ha experimentado un rápido desarrollo como respuesta a la demanda de una creciente población humana. Durante las últimas décadas, se ha producido un aumento dramático en el uso de herbicidas y otros productos químicos en respuesta a esta necesidad de rápido crecimiento. Como consecuencia, estos herbicidas pueden entrar en los ecosistemas acuáticos por diversas vías, principalmente mediante los efluentes agrícolas, lo que los ha convertido en los contaminantes orgánicos más frecuentes en estos ambientes en la actualidad (Cerejeira et al., 2003, Törnqvist et al., 2011).

A pesar de los esfuerzos dirigidos al desarrollo de pesticidas más seguros ambientalmente, de acción más específica, menos persistentes en el medio y de menor tasa de aplicación, estas sustancias continúan siendo una seria amenaza para los ecosistemas terrestres y acuáticos (Forbes y Forbes, 1994, Lorente et al., 2014, Magnusson et al., 2013, Relyea, 2005).

El herbicida estudiado en este trabajo, la atrazina (ATZ), altera a la fotosíntesis a nivel del PSII; su uso está prohibido en Europa desde el año 2003 por la Comisión Europea (EC SANCO/10496/2003-final). Esto conduce a su perdurable lixiviación y a la presencia de altos niveles de este herbicida en los diferentes ecosistemas incluso años después de su prohibición (Lorente et al., 2014), por lo que la atrazina sigue siendo detectada habitualmente en el medio ambiente debido a su largo tiempo de retención en el suelo y en los acuíferos. Además, la ATZ no ha sido prohibida en Estados Unidos por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y es uno de los herbicidas más utilizados en este país (US EPA, 2013). Debido a su gran uso en Estados Unidos, la EPA ha hecho estudios detallados de los posibles efectos sobre la salud ambiental que están disponibles en la base de datos del Sistema Integrado de Información sobre Riesgos (IRIS). De acuerdo con estos estudios, la EPA recomienda que las concentraciones se mantengan por debajo de $37,5 \mu\text{g L}^{-1}$ en aguas naturales no tratadas, medidas en un lapso de 90 días, para asegurar la protección de las embarazadas, y que las concentraciones máximas en aguas tratadas potables sea de $3 \mu\text{g L}^{-1}$ para proteger a la población de los efectos crónicos a largo plazo. Se cree que la exposición a niveles de atrazina más altos puede afectar el equilibrio hormonal en el organismo. La OSHA (Administración de Seguridad y Salud Ocupacional) ha establecido un límite en el trabajo de atrazina de 5mg m^{-3} en el aire durante una jornada de 8 horas diarias. Para proteger a los trabajadores de la posibilidad de que la ATZ produzca cáncer, el NIOSH (Instituto Nacional de Salud y Seguridad Ocupacional) recomienda una norma para exposición ocupacional de 5mg m^{-3} durante una jornada de 10 horas y los niveles máximos de atrazina que la EPA permite en alimentos varían entre $0,02$ y 15mg L^{-1} . En cuanto a los efectos sobre el ecosistema acuático, el nivel de alerta se ha establecido en $10 \mu\text{g}$

L⁻¹ a lo largo un período de 60 días de medición. Este valor se obtuvo utilizando el modelo PATI (*Plant Assemblage Toxicity Index*) en plantas acuáticas. La EPA establece que si los valores de atrazina se muestran por encima de 10 µg L⁻¹ en dos años, hay que tomar medidas de control en la cuenca del río. Además, la ATZ está designada como plaguicida de uso restringido en Norteamérica, lo que significa que solamente personas certificadas pueden usar atrazina, pero está permitida en África, Asia y América Latina.

Debido a su persistencia en los medios acuáticos y su potencialidad para causar daños medioambientales es necesario un seguimiento para monitorizar la calidad química de las aguas. Incluyendo estudios de sus efectos sobre organismos no diana, como son las microalgas. Estos microorganismos son los principales productores primarios acuáticos y debido a su posición ecológica, cualquier agente químico que altere la comunidad fitoplanctónica y/o su producción primaria puede provocar desequilibrios en niveles tróficos superiores, generando graves consecuencias en los ecosistemas (Campanella et al., 2001, Martínez et al., 2014, Rioboo et al., 2007).

Por ello, las microalgas se están utilizando como indicadores biológicos en estudios para la evaluación de la potencial toxicidad de diferentes contaminantes, como los pesticidas, en ecosistemas dulceacuícolas. De hecho, los bioensayos basados en la inhibición del crecimiento de las microalgas *Raphidocelis subcapitata* y *Scenedesmus subspicatus* están incluidos dentro de los bioensayos de toxicidad obligados para el registro y notificación de nuevos productos químicos, tanto en la Unión Europea como en los Estados Unidos (ISO 8692, 2012).

Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, las microalgas están poco representadas como organismos de ensayo en los métodos estandarizados y normalmente recomendados. Por lo que es necesario introducir especies microalgales nuevas y más sensibles que puedan ser utilizadas en bioensayos de ecotoxicidad, de modo que en cada caso se pueda elegir el método más apropiado, teniendo en cuenta la naturaleza del medio acuático que se pretende proteger y los organismos que habitan naturalmente en dicho medio, para que el sentido ecológico de los ensayos realizados sea cada vez mayor.

En los últimos años se han desarrollado bioensayos basados en nuevos parámetros y métodos cada vez más rápidos, sencillos, prácticos y sensibles para la detección de contaminantes y el estudio de su toxicidad, pero el crecimiento sigue siendo el parámetro más utilizado hasta la fecha para estudiar los efectos de compuestos tóxicos sobre las microalgas en los ensayos de toxicidad crónicos (van Wezel y van Vlaardingen, 2004), aunque este parámetro no proporciona información de los mecanismos de acción tóxicos de los

contaminantes sobre los procesos biológicos microalgales.

La determinación de la densidad celular o número de células como medida del crecimiento microalgal es un parámetro fundamental en los ensayos de toxicidad de cualquier agente. En numerosos ensayos, la toxicidad se mide en función de la reducción de la tasa de crecimiento, o de la biomasa final, en relación a un control (Debelius et al., 2008, Hogan et al., 2005, Nie et al., 2009, Pereira et al., 2009, Strom et al., 2009).

Los resultados obtenidos en el presente estudio reflejan que el efecto de la atrazina sobre el crecimiento de *C. reinhardtii* es dependiente de la concentración, de modo que se observa un efecto negativo del herbicida sobre el crecimiento, más evidente cuanto mayor es la concentración de ATZ en el medio de cultivo. A las 96 h se observa una disminución significativa del crecimiento ($0,92 \pm 0,02 \text{ día}^{-1}$) celular a la concentración de $0,1 \mu\text{M}$ del herbicida, la más baja ensayada, con respecto a los cultivos control ($1,13 \pm 0,02 \text{ día}^{-1}$). Respecto a la tasa de crecimiento a las 24 h se observa una disminución significativa en los cultivos expuestos a $0,25 \mu\text{M}$ de atrazina ($0,94 \pm 0,03 \text{ día}^{-1}$) respecto a los cultivos control ($1,73 \pm 0,20 \text{ día}^{-1}$). Resultados parecidos se han obtenido en otras especies microalgales (Bérard et al., 2003, DeLorenzo et al., 2004, Fischer et al., 2010, Solomon et al., 1996, Tang et al., 1997, Weiner et al., 2004).

Entre los diferentes índices que permiten evaluar el efecto del herbicida sobre el crecimiento microalgal para poder comparar los resultados experimentales obtenidos bajo diferentes condiciones en diferentes laboratorios, el valor EC_{50} es el más utilizado en ensayos de toxicidad. La concentración que provoca una inhibición del 50% en el crecimiento de esta especie después de 96 h de exposición a ATZ, obtenida en este trabajo, es aproximadamente $0,25 \mu\text{M}$. Esta concentración fue la elegida para realizar un estudio más detallado a nivel citómico, proteómico y transcriptómico.

Dada la variabilidad en la sensibilidad de los organismos fitoplanctónicos a los herbicidas (Ma et al., 2006, Wong, 2000), se han llevado a cabo diversos estudios para evaluar la toxicidad de la atrazina sobre diferentes especies o grupos, con el fin de poder establecer unos límites legales a su aplicación de modo que, en el caso de que este herbicida llegue a las aguas naturales, no afecte o se minimice el daño a este eslabón fundamental de la cadena trófica. En estos trabajos, el crecimiento ha sido uno de los parámetros más analizados. Los valores de EC_{50} (96 horas) para el crecimiento obtenidos en este estudio están dentro del rango de valores publicados en la literatura para diferentes especies microalgales después de las mismas horas de exposición a atrazina (Tabla 3).

Tabla 3. EC₅₀ a las 96 h para el crecimiento de diferentes especies microalgales expuestas a atrazina.

EC ₅₀ para el crecimiento (96 h)	Especie	Referencia bibliográfica
0,33 µM	<i>Chlorella fusca</i>	Kotrikla et al., 1999
0,20 µM	<i>Chlorella vulgaris</i>	Bérard et al., 2003
0,26 µM	<i>Scenedesmus acutus</i>	Bérard et al., 2003
0,32 µM	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Weiner et al., 2004
0,28 µM	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Weiner et al., 2004
0,42 µM	<i>Isochrysis galbana</i>	Weiner et al., 2004
0,21 µM	<i>Synechococcus sp.</i>	Weiner et al., 2004
0,16 µM	<i>Chlamydomonas intermedia</i>	Bérard et al., 2003
0,15 µM	<i>Chlamydomonas mexicana</i>	Kabra et al., 2014
0,27 µM	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Fernandez-Naveira et al., 2016
0,23 µM	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Weiner et al., 2004
0,53 µM	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Bérard et al., 2003
0,51 µM	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Ma et al., 2006

La diferente sensibilidad a la atrazina por parte de las especies microalgales puede atribuirse a la variabilidad de morfología, citología, fisiología y filogenética (Debelius et al., 2008), por los datos expuestos (Tabla 3) parece que el género *Chlamydomonas* es de los más sensibles al herbicida atrazina.

Como se ha indicado, los ensayos de toxicidad basados en la inhibición del crecimiento de la microalgas han sido frecuentemente utilizados para el estudio del impacto ambiental de diversos contaminantes en los sistemas acuáticos (Adler et al., 2007, Bi Fai et al., 2007). De hecho, los datos obtenidos en estos ensayos se utilizan en la evaluación del riesgo ecológico para el establecimiento de directrices para la descarga de efluentes contaminantes (Nancharaiyah et al., 2007). Sin embargo, estos ensayos presentan varias limitaciones, entre las cuales destaca el hecho de que la inhibición del crecimiento es un parámetro poblacional, que refleja un valor medio de la población estudiada sin tener en cuenta la respuesta que se produce a nivel celular (Geoffroy et al., 2007). Puesto que los cambios ambientales afectan directamente a las células antes de que se manifieste el efecto sobre la población, resulta conveniente la medida de parámetros a nivel de las células individuales. Una de las ventajas de la citometría de flujo (FCM) radica precisamente en que permite llevar a cabo la medida de

parámetros a nivel de la célula, posibilitando el estudio tanto de propiedades inherentes a la célula (tamaño, complejidad celular y autofluorescencia, como en el caso de los organismos fotosintéticos como las microalgas), como de diversos componentes celulares y procesos metabólicos mediante el uso de marcadores fluorescentes (Dubelaar y Jonker, 2000, Jochem, 2000).

La medida de parámetros relacionados con la autofluorescencia natural de las microalgas ha permitido el desarrollo de métodos simples, rápidos y sensibles para detectar efectos fotoinhibidores de los contaminantes ambientales. Los organismos fototróficos son autofluorescentes debido a los pigmentos que poseen, lo que permite un análisis no invasivo, es decir, sin necesidad de marcadores fluorescentes externos. En diversos estudios se considera que la molécula de clorofila constituye un indicador de la capacidad fotosintética del organismo (Eullaffroy y Vernet, 2003). El PSII es el componente del aparato fotosintético donde se genera la mayor parte de la emisión *in vivo* de la fluorescencia de la clorofila *a*, de modo que cualquier daño que se produzca en este fotosistema provocará un descenso de la emisión de fluorescencia detectada por el citómetro de flujo (Neale et al., 1989, Sobrino et al., 2005). De hecho, los cambios en la fluorescencia de la clorofila *a* se han utilizado para estudiar el estado fisiológico de células microalgales sometidas a diferentes factores de estrés (Chalifour et al., 2009, Ekelund y Aronson, 2007, González-Barreiro et al., 2004, Hadjoudja et al., 2009, Sobrino et al., 2004). Por otro lado, hay estudios que demuestran una relación lineal entre la fluorescencia de la clorofila *a* y la concentración celular de clorofila (Galbraith et al., 1988; Graziano et al., 1996, Veldhuis y Kraay, 2000).

En este estudio se observa que la ATZ (0,25 μM) tras sólo 3 h de exposición afecta a la fluorescencia de la clorofila *a*, medida mediante FCM, provocando una reducción del 16% con respecto a los cultivos control. Este resultado también se corresponde con los datos obtenidos al estudiar el contenido de pigmentos fotosintéticos, donde se observa una reducción significativa ($p \leq 0,05$) del 26,7% y del 29,4%, en la clorofila *a* y en los carotenoides, respectivamente. Sin embargo en la clorofila *b*, la reducción que se observa no es significativa ($p \geq 0,05$).

Los resultados obtenidos indican una reducción de la actividad fotosintética que está relacionada con el mecanismo de acción de este herbicida (Fig. 21). La atrazina interfiere en el transporte de electrones en el fotosistema II (PSII) (Bi Fai et al., 2007, Chalifour et al., 2009, Moreland, 1980, van der Heever y Grobbelaar, 1998). El sitio de unión de la atrazina está localizado en la proteína D1 del PSII; esta unión provoca el bloqueo de la cadena de electrones

de la quinona A (Q_A) a la quinona B (Q_B), el aceptor primario y secundario de electrones respectivamente (Diner y Petrouleas, 1987). En general, se produce la competencia con la plastoquinona por el sitio de unión (Q_B) de la proteína D1 en el centro de reacción del PS II, lo que provoca la interrupción de la transferencia de electrones y, por lo tanto, la síntesis de ATP y NADPH (Jones et al., 2003, Oettmeier et al., 1992).

Estudios sobre las alteraciones fotosintéticas bajo condiciones de estrés, han establecido una relación entre el estrés fotosintético y el contenido de proteína D1 (Giardi et al., 1997). La proteína D1 es la principal diana de los herbicidas que inhiben la fotosíntesis. De hecho, una mutación puntual en el gen *psbA* que codifica para la proteína D1 del PSII confiere resistencia a las triazinas en las células vegetales (Hirschberg y McIntosh, 1983). El PSII produce singletes de oxígeno para amortiguar el estado triplete de la clorofila del centro de reacción P680 y esos singletes inducen la degradación de la proteína D1. Esta proteína es constantemente degradada, resintetizada y reensamblada en un nuevo PSII funcional. Este proceso de inactivación y reparación del PSII se llama renovación de la proteína D1 (Mattoo et al., 1984). En células fotosintéticas vivas no sometidas a condiciones de estrés, la tasa de reparación del PSII está equilibrada con la tasa de daño (Xia, 2005). Pero ante condiciones ambientales estresantes, la compensación no será suficiente al reducirse la tasa de reparación, lo que rompe el equilibrio y, como consecuencia, la actividad del PSII disminuye (Kruk et al., 2005 y Nishiyama et al., 2005). Se sabe que los herbicidas que afectan al PSII retrasan la degradación de la proteína D1 (Jansen et al., 1993, Nakajima et al., 1996, Zer y Ohad, 1995). Además, Pace et al. (2001) han propuesto que la interrupción de la fotosíntesis de células expuestas a altas concentraciones de herbicidas es debida a la interferencia con la tasa de renovación de la D1. La unión del herbicida podría bloquear el acceso de proteasas al sitio de unión del nicho Q_B o podría causar un cambio conformacional que restrinja la accesibilidad a este sitio. La unión de las triazinas al Q_B no sólo bloquearía el transporte electrónico fotosintético, sino que también evitaría la reparación de la proteína D1 dañada, por lo que la tasa de renovación de la proteína D1 podría ser una parte importante del mecanismo de resistencia a herbicidas en las células vegetales, debido a una degradación más rápida o a una sobreproducción de la proteína (Pace et al., 2001).

Los resultados obtenidos indican que los cloroplastos de *C. reinhardtii* no sólo se hallan afectados a nivel de la actividad fotosintética después de una corta exposición a ATZ, sino que el contenido celular de pigmentos también presenta alteraciones con respecto a los valores de las microalgas de los cultivos control. Clorofilas y carotenoides están presentes en complejos proteicos en las membranas de los tilacoides, donde interaccionan mutuamente y juegan

múltiples roles en la fotosíntesis (Tukaj et al., 2003). Los pigmentos se utilizan habitualmente como biomarcadores de exposición a herbicidas en plantas, incluyendo las algas (Couderchet y Vernet, 2003). Aunque otros autores no detectaron que la ATZ y otras triazinas, provocaran cambios importantes en la cantidad de clorofilas (Macinnis-Ng y Ralph, 2003, Saladin et al., 2003), los resultados de este trabajo muestran que la atrazina altera el contenido intracelular de pigmentos en *C. reinhardtii* tan sólo tras 3 h de exposición. Esto podría deberse a un bloqueo en la síntesis de pigmentos, como consecuencia de la deficiencia energética observada en estos cultivos debido a la alteración de la fotosíntesis. Esta reducción en los niveles de pigmentos puede reflejar importantes alteraciones en la membrana del cloroplasto, cuando probablemente los mecanismos de protección de la célula se ven superados por los niveles de estrés (Macinnis-Ng y Ralph, 2004). Además, si la atrazina inhibe la síntesis de clorofila, provocaría que estos pigmentos, que presentan una alta tasa de renovación, al no poder ser resintetizados, disminuyeran en la célula (Couderchet y Vernet, 2003). Por otro lado, los compuestos que afectan al PSII causan una superproducción de tripletes de clorofila excitados que provocan la formación de singletes de oxígeno (Krieger-Liszkay, 2005, Saladin et al., 2003). Este estrés oxidativo es responsable de la oxidación de los pigmentos, especialmente de los carotenoides y, por tanto, del descenso observado en las concentraciones de los mismos en los cultivos expuestos a atrazina. Los carotenoides de las algas verdes juegan un papel estructural y funcional en ambos fotosistemas, similar al que juegan en las plantas superiores, donde son esenciales en el ensamblaje del PSII activo, mientras que el PSI podría ser sintetizado en ausencia de carotenoides (Tukaj et al., 2003).

En la actualidad, con el desarrollo de las ómicas, nuevas alternativas surgen para estudiar los efectos de los contaminantes en las microalgas (Dowling y Sheehan, 2006, Jamers et al., 2009, Monsinjon y Knigge, 2007). La transcriptómica y proteómica pueden utilizarse para detectar y caracterizar las respuestas a estímulos externos y tiene un gran potencial para investigar los mecanismos de estrés y las respuestas que afectan al crecimiento y a otros parámetros fisiológicos y bioquímicos (Jamers y de Coen, 2010, Nestler et al., 2012, Subramanian et al., 2014), aplicándose cada vez más en el campo de las ciencias biológicas y ecotoxicología. La disponibilidad del genoma secuenciado de la especie *Chlamydomonas reinhardtii*, con una adecuada anotación y una detallada información de la ruta metabólica, facilita el análisis del perfil transcriptómico y proteómico de la microalga (Merchant et al., 2007). En este estudio, además de los cambios observados en la fotosíntesis por citometría de flujo y por espectrofotometría, se llevaron a cabo estudios transcriptómicos y proteómicos para analizar cambios en genes y proteínas relacionados con la fotosíntesis.

Los datos de RNA-Seq mostraron 9 genes expresados diferencialmente con respecto al control tras 3 h de exposición a ATZ relacionados con el proceso de fotosíntesis. 6 de los 9 genes (*LHCBM8*, *LHCSR3*, *LI818R-1*, *PTOX2*, *CAH4* y *CAH5*) aparecen subexpresados y 3 sobreexpresados (*HLA3*, *LCIA* y *ELI3*). Los transcritos que codifican genes para la captación de luz, el mecanismo de concentración de carbono o proteínas de unión a clorofilas son menos abundantes en las células de los cultivos expuestos durante 3 h. Esto se relaciona con los datos obtenidos anteriormente donde se observó un descenso de la autofluorescencia celular y un descenso de la cantidad de pigmentos. Sin embargo, algunos transcritos aparecen sobreexpresados en los cultivos expuestos, se puede asumir que dichos transcritos fotosintéticos se acumulan para asumir un papel de aclimatación del organismo fotosintético al estrés provocado por el herbicida. La técnica de RNA-Seq permite el estudio de una rápida respuesta al estrés, pero también es importante considerar las alteraciones tempranas en el perfil proteómico. Dicho perfil reveló 5 proteínas que son significativamente menos abundantes en los cultivos expuestos (*CA2*, *PSBO*, *PSB1*, *PRK1*, *ATPD*). La comparación entre los cambios observados en el perfil transcriptómico y el proteómico indican que las variaciones detectadas en este último después de sólo 3 h de exposición al herbicida son principalmente debidas al estrés causado directamente por la atrazina sobre las proteínas, y no debido a un cambio en los procesos reguladores de la expresión génica.

En definitiva, una concentración subletal de atrazina (0,25 μM) altera el perfil transcriptómico y proteómico de células de *Chlamydomonas reinhardtii* tras 3 h de exposición al herbicida (Fig. 21). La ATZ provoca desajustes fotosintéticos en las células de *C. reinhardtii* basadas en las alteraciones observadas en el perfil transcriptómico, así como la desaparición de algunas proteínas relacionadas con la fotosíntesis. Por un lado, los niveles de transcritos que codifican para proteínas de la clorofila, componentes del PSII y anhidrasa carbónica, que ayudan a aumentar la concentración de CO_2 en el cloroplasto, se redujeron. Por otra parte, algunos transcritos que codifican para transportadores de carbono inorgánico (Ci) fueron sobreexpresados como una respuesta celular para aclimatarse al estrés provocado por el herbicida. También se observa que la cantidad de proteínas que forman parte del PSII, una cloroplasto ATP sintasa y una anhidrasa carbónica que participa en la regulación del proceso de fijación de carbono, disminuyen debido al estrés provocado por este herbicida. La inhibición de la fotosíntesis inducida por la toxicidad de la ATZ afecta al estado fisiológico y bioquímico de las células microalgales. Los resultados de reducción en el contenido de pigmentos celulares y de la fluorescencia de la clorofila *a*, se relacionan con resultados obtenidos en otros estudios, donde el estrés provocado por este herbicida hace que las células microalgales cambien de un

metabolismo fototrófico, ineficiente en estas condiciones, a un metabolismo heterótrofo, como se comentará más adelante. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el aumento de algunos contaminantes en los sistemas acuáticos podría conducir a una disminución dramática en la fijación del CO₂ a nivel mundial.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que parámetros relacionados con la fotosíntesis son sensibles y pueden ser utilizados como una buena alternativa al crecimiento, como otros autores han propuesto (Petersen y Kusk, 2000). Es importante destacar que las microalgas actúan como productores en los ecosistemas acuáticos, por lo que el equilibrio ecológico puede ser fácilmente dañado si la fotosíntesis se ve afectada por la alteración del medio. Por ello, la medida de la actividad fotosintética resulta importante para monitorizar la degradación medioambiental de los ecosistemas acuáticos (Endo y Omasa, 2004) y debe ser uno de los biomarcadores principales de la ecotoxicología o toxicología medioambiental (Schreiber et al., 2007).

Como ya se comentó anteriormente, uno de los mayores inconvenientes de los bioensayos de toxicidad basados en la inhibición del crecimiento de las microalgas es la incapacidad para distinguir entre células vivas y muertas (Nancharaiyah et al., 2007). Además, en los últimos años, la FCM se ha utilizado cada vez con más frecuencia en estudios ambientales. Muchos de estos estudios se han centrado en la discriminación de células viables y no viables dentro de la población analizada que ha estado expuesta a las condiciones de estrés (Adler et al., 2007, Lage et al., 2001).

Una de las características que distinguen a las células no viables de las células viables es la pérdida de la funcionalidad e incluso la pérdida de la integridad estructural de la membrana plasmática celular. De este modo, se han desarrollado diversos métodos para evaluar la viabilidad celular que se basan precisamente en los cambios que se producen en las propiedades de la membrana cuando la célula muere. Así, uno de los métodos comúnmente utilizados se basa en el uso de la FCM o microscopía de fluorescencia en combinación con fluorocromos DNA-específicos que son excluidos por las células viables, que tienen su membrana intacta, permitiendo una tinción selectiva de las células no viables (Darzynkiewicz, 1992). Dentro de este tipo de fluorocromos, el más utilizado es el yoduro de propidio (PI), en el cual se basa uno de los ensayos de viabilidad celular utilizados en este trabajo.

En el presente estudio, aunque una disminución significativa fue observada en la tasa de crecimiento tras 24 h de exposición al herbicida, la viabilidad celular no se vio afectada por la concentración ensayada tras 3 y 24 h de exposición, lo que significa que 0,25 µM de atrazina

es una concentración subletal para esta microalga. Resultados parecidos se obtuvieron en otros estudios donde las células microalgales expuestas a ATZ no pudieron terminar su división celular, pero mantuvieron su actividad metabólica y la viabilidad celular (González-Barreiro et al., 2004).

La potencial estimulación de los mecanismos de defensa antioxidantes (Chankova et al., 2014, Dewez et al., 2005), como se comentará más adelante, podría estar involucrada en el mantenimiento de la viabilidad celular. Los resultados obtenidos indican que la integridad de la membrana citoplasmática se verá afectada sólo después de que otros parámetros celulares ya hayan sido dañados de un modo notable por el herbicida. Sin embargo, se ha observado que otros contaminantes que también generan un estrés oxidativo en la célula, como el cobre, el cloro o el paraquat, provocan una reducción de viabilidad celular en microalgas (Cid et al., 1996a, Franqueira et al., 2000, Lage et al., 2001, Nancharaiah et al., 2007, Prado et al., 2011, Stauber et al., 2002). También se ha observado que diferentes contaminantes emergentes, como el triclosan y el ibuprofeno, producen mortalidad en diferentes cultivos de *Chlamydomonas* (Gonzalez-Pleiter et al., 2017, Prado et al., 2015) al igual que el filtro solar benzofenona-3, el desinfectante triclosan, la fragancia tonalide y los antibióticos cloranfenicol, florfenicol y oxitetraciclino, producen cambios significativos en la viabilidad de *Tetraselmis suecica* (Seoane et al., 2014, Seoane et al., 2017).

Además de los ensayos de viabilidad centrados en la permeabilidad de la membrana plasmática, las medidas de la inhibición de determinadas enzimas en microalgas se utilizan cada vez más como indicadores del estrés ambiental, puesto que permiten obtener resultados de manera rápida y sensible (Blaise y Ménard, 1998, Peterson y Stauber, 1996, Prado et al., 2012a, Prado et al., 2012b). Concretamente, la actividad esterasa ha demostrado ser un indicador útil, mostrando una buena relación con la actividad metabólica y la viabilidad celular, dado que las esterases son enzimas esenciales para el funcionamiento normal de la célula. En algas, la actividad esterasa ha demostrado ser un parámetro sensible, capaz de detectar alteraciones ambientales mínimas, como cambios en la temperatura, luz, salinidad, turbulencia, nutrientes o fase de crecimiento (Brookes et al., 2000, Geary et al., 1997, Jochem, 1999, Minier et al., 1993, Regel et al., 2004).

El análisis de la hidrólisis del fluorocromo FDA llevada a cabo por enzimas esterases ha sido habitualmente utilizado para estimar la actividad microbiana en suelos (Schnürer y Rosswall, 1982), aguas (Holzapfel-Pschorn et al., 1987, Tadonlécé et al., 2009) y sedimentos marinos (Gumprecht et al., 1995). También se ha utilizado para estudiar la viabilidad de células

animales (Hoppe y Bavister, 1984, Paniagua-Chávez et al., 2006) y la viabilidad/actividad metabólica de microalgas (Gilbert et al., 1992, Jochem, 2000, Prado et al., 2012a).

En la mayoría de los estudios en los que se ha utilizado este ensayo para caracterizar la respuesta de diversas especies de microalgas a diversos contaminantes, fundamentalmente metales, se ha hecho de una forma cualitativa, clasificando las células en grupos según su estado metabólico y basándose en cómo varía el porcentaje de células en cada uno de esos grupos en función de la mayor o menor concentración del agente tóxico (Franklin et al., 2001). En el presente trabajo, se determinó la actividad enzimática a través de un análisis *in fluxo* por citometría de flujo, monitorizando cómo se incrementa la fluorescencia a medida que se produce la transformación del sustrato fluorogénico en producto fluorescente hasta llegar a la estabilización del proceso, lo que permite obtener una medida cuantitativa de dicha actividad. La detección mediante FCM de la fluorescencia de la fluoresceína resultante de la hidrólisis del FDA se ha aplicado para la determinación de la toxicidad de diversos agentes contaminantes, como metales pesados (Arsenault et al., 1993, Lage et al., 2001) y pesticidas (Gilbert et al., 1992, Prado et al., 2012a, Prado et al., 2012b) en diversas especies fitoplanctónicas.

Los resultados obtenidos muestran un efecto negativo de la ATZ sobre la actividad esterasa inespecífica de *C. reinhardtii*. La actividad celular disminuyó el 31% y el 29% a las 3 y 24 horas, respectivamente, en los cultivos expuestos a 0,25 μM del herbicida con respecto al control (Fig. 21). Como se comentó anteriormente, no se observaron cambios significativos en el porcentaje de células viables, sin embargo la actividad celular en las células viables se vio afectada a ambos tiempos ensayados. Estos resultados se podrían relacionar con los datos de crecimiento a las 24 h, donde se observa una reducción del 50% del crecimiento en los cultivos expuestos a atrazina con respecto a los controles. Estudios previos también detectaron un descenso en la actividad esterasa en células de *Chlamydomonas* expuestas a diferentes herbicidas (Jamers y de Coen, 2010, Nestler et al., 2012, Prado et al., 2012a, Prado et al., 2012b) y a contaminantes emergentes (Prado et al., 2015).

Se ha observado que existe una buena correlación entre la tasa de conversión del FDA en fluoresceína, es decir, la actividad esterasa, y la actividad fotosintética (Brookes et al., 2000, Dorsey et al., 1989). De este modo, es lógico que un herbicida que actúa a nivel de la fotosíntesis, tenga un efecto negativo sobre esta actividad enzimática. Además, el estrés oxidativo generado por la superproducción de especies reactivas de oxígeno puede inducir alteraciones en la propia estructura del enzima, pasando a ser no funcional, o causar la degradación oxidativa de la misma, lo que conlleva a un descenso general de la actividad

metabólica celular.

La membrana plasmática constituye una barrera quimiosmótica que, en el caso de los microorganismos como la microalgas, proporciona la superficie de contacto entre el organismo y su ambiente externo. A través de esta membrana, se mantiene un potencial electroquímico transmembrana (negativo en el interior de la célula) que juega un papel crítico en el control del intercambio de solutos. Los principales iones monovalentes implicados en los gradientes a través de esta bicapa son Na^+ , K^+ , H^+ y Cl^- , aunque también son importantes algunos cationes divalentes como el Ca^{2+} . Este desequilibrio en la concentración de determinados iones a través de la membrana que delimita la célula se mantiene gracias a procesos de transporte mediante diferentes bombas y canales que requieren energía (Lloyd et al., 2004). Se considera que cualquier alteración que se produzca en este potencial eléctrico transmembrana, en respuesta a determinados cambios en el ambiente circundante a la célula, es un mediador de respuestas fisiológicas celulares que se producen como consecuencia de esos estímulos ambientales. De este modo, la monitorización de estas perturbaciones en el potencial de membrana citoplasmático de la célula resulta interesante como indicador de factores ambientales que pueden conducir a cambios fisiológicos funcionalmente importantes para la célula (Rabinovitch y June, 1990), posiblemente desembocando en citotoxicidad o incluso en muerte celular.

El potencial de membrana es dependiente de la energía metabólica, de modo que este potencial decae una vez eliminadas las fuentes de energía en la célula; por otro lado, las propiedades de permeabilidad de la membrana van a influenciar el mantenimiento del gradiente electroquímico que garantiza la existencia del potencial de membrana, de modo que el potencial de membrana disminuye cuando la membrana plasmática resulta dañada por agentes físicos o químicos. Por tanto, sólo las células metabólicamente activas y cuya membrana esté intacta van a ser capaces de generar y mantener un potencial de membrana normal (Jepras et al., 1997). Concretamente, el fluorocromo DiBAC₄(3) ha demostrado su utilidad como indicador de viabilidad en diversos estudios, fundamentalmente con bacterias, en los que las células que han perdido su potencial de membrana, y que por tanto muestran una elevada fluorescencia como consecuencia de la entrada del fluorocromo, se consideran células muertas (Jepras et al., 1995, Papadimitriou et al., 2006). Estudios previos en diferentes microorganismos han reportado cambios en la permeabilidad de la membrana citoplasmática utilizando la citometría de flujo (Bouix y Ghorbal, 2015, Lloyd et al., 2004, Wickens et al., 2000).

Estudiando el efecto de la ATZ sobre el potencial de membrana citoplasmática de *C. reinhardtii*, se observa que el herbicida induce la despolarización de un porcentaje significativo

de las células microalgales con respecto a los cultivos control, 33% y 31% a las 3 y 24 h de exposición, respectivamente (Fig. 21). Esta despolarización de la membrana citoplasmática también se observó en la misma microalga expuesta a triclosan (González-Pleiter et al., 2017) y en *C. moewusii* expuesta al herbicida paraquat (Prado et al., 2012a).

Aunque el uso de fluorocromos sensibles al potencial de membrana citoplasmática como indicadores de viabilidad celular se ha ido incrementando en los últimos años, es bastante cuestionable si las células que muestran un potencial de membrana reducido son necesariamente células no viables (Breeuwer y Abee, 2000). De hecho, en el presente estudio se observa que la exposición de *C. reinhardtii* a atrazina durante 3 y 24 h induce la despolarización de la membrana citoplasmática en un porcentaje significativo de la población celular analizada, pero los resultados obtenidos en el ensayo con el fluorocromo PI indican que la viabilidad celular no se ve significativamente afectada, así como los resultados obtenidos en el ensayo de la actividad esterasa muestran que estas células poseen esta actividad enzimática, aunque reducida con respecto al control (Fig. 21).

Como ya se ha mencionado, cualquier perturbación en el potencial de membrana citoplasmática se puede considerar un indicador sensible y rápido de la presencia de factores ambientales que posiblemente conduzcan a cambios fisiológicos funcionalmente importantes en la célula, conllevando muchas veces el inicio de cascadas citotóxicas que pueden causar finalmente la muerte celular. Por ejemplo, la presencia de elevados niveles de ROS se considera una respuesta celular común a factores de estrés ambiental (Mittler, 2002, Valavanidis et al., 2006) y se ha relacionado con alteraciones significativas del potencial de membrana citoplasmática (Scott y Rabito, 1988), concretamente con una reducción del potencial de membrana, es decir, con una despolarización de la membrana citoplasmática (Scott et al., 1987, Lloyd et al., 2000, Wei et al., 2008).

Podríamos concluir que la exposición a ATZ daña la membrana plasmática de las células microalgales, principalmente mediante cambios en sus propiedades de permeabilidad, más que por la disrupción de su integridad. A menudo se ha relacionado la despolarización de la membrana citoplasmática con la inhibición de las bombas H^+ -ATPasas o bombas Na^+K^+ -ATPasas de la membrana, puesto que estas bombas se consideran los principales generadores de los gradientes electroquímicos a través de la membrana plasmática, es decir, de los potenciales de membrana (Bortner et al., 2001, Krol et al., 2003). Existen evidencias de la inhibición irreversible de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa por la presencia de especies reactivas de oxígeno (Wu-Hsiung et al., 1992), de modo que el estrés oxidativo en la célula puede inhibir

esta actividad enzimática y contribuir a la despolarización de la membrana citoplasmática.

Después de estudiar los efectos a nivel de la fotosíntesis y de las alteraciones observadas a nivel de la membrana plasmática, es importante estudiar los posibles daños en otro orgánulo de gran importancia para la célula, la mitocondria. El análisis del potencial de membrana mitocondrial ha sido ampliamente utilizado como una aproximación a la medida de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial (Cossarizza y Salvioli, 2001, Pham et al., 2000, Poot y Pierce, 2001).

En el presente estudio, se observa un aumento del potencial de membrana mitocondrial de *C. reinhardtii* como consecuencia de la exposición a ATZ. La tinción con el fluorocromo JC-1 muestra una hiperpolarización significativa de 2,18 y 1,36 veces más que el control, tras 3 y 24 h de exposición, respectivamente (Fig. 21).

El mecanismo de acción de la ATZ afecta a la fotosíntesis, pero también podría provocar perturbaciones en la cadena respiratoria mitocondrial. En varios estudios se demostró que fisiológicamente, la hiperpolarización mitocondrial podría deberse a un aumento en la respiración, con un incremento del flujo de electrones y con una fosforilación oxidativa más activa y por lo tanto, posibles fugas de electrones que favorecerán la generación de ROS, como un subproducto del proceso de generación de ATP (Huc et al., 2012, Loseva et al., 2004, Wallace, 2005). La toxicidad de la atrazina en la cadena respiratoria mitocondrial ha sido estudiada en roedores y células humanas (Chen et al., 2015, Koo et al., 2012). Además, otros estudios en animales y células vegetales han observado que el herbicida paraquat provoca una despolarización de la membrana mitocondrial interna y un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Constantini et al., 1995, Esperanza et al., 2015, Palmeira et al., 1995, Prado et al., 2012b, Vicente et al., 2001). En otros estudios realizados en *C. reinhardtii* diversos compuestos como nanopartículas, herbicidas y productos de cuidado personal alteran de forma significativa el potencial de membrana citoplasmática (Cheloni et al., 2016, González-Pleiter et al., 2017, Prado et al., 2015).

El calcio es un nutriente esencial para las células vegetales (Epstein y Bloom, 2005), cumpliendo funciones estructurales y metabólicas (Plieth, 2005). Es necesario como constituyente estructural de las paredes y de las membranas celulares, como catión contrarrestando a los aniones inorgánicos y orgánicos en la vacuola y además, el calcio citosólico libre actúa como mensajero intracelular en el citosol (Marschner, 1995, Sun et al., 2006). El calcio penetra por difusión simple en las células vegetales, a través de canales permeables en la membrana plasmática (White, 2000). Debido a que elevados niveles de calcio

libre en el citosol pueden resultar tóxicos para la célula, dichos niveles se mantienen a concentraciones submicromolares, principalmente gracias a la acción de bombas Ca^{2+} -ATPasas y de los transportadores de intercambio antiporte de calcio y protones (Hirschi, 2001, Sanders et al., 1999, Sze et al., 2000). Dichas bombas retiran el calcio del citosol en contra de un gradiente electroquímico hacia el medio extracelular o hacia el interior de orgánulos como la vacuola, el retículo endoplasmático y el cloroplasto. Los movimientos de iones entre los diferentes compartimentos celulares provocan alteraciones en los niveles de calcio libre citosólico, que van a actuar como señales frente a estímulos intracelulares y ambientales (Sanders et al., 2002). En el presente trabajo, los resultados obtenidos reflejan un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de los niveles de calcio citosólico, utilizando el fluorocromo *Calcium Green-1*, en las células de *C. reinhardtii* tras 24 h de exposición a $0,25 \mu\text{M}$ de herbicida ($113,60 \pm 4,59\%$), con respecto a los cultivos control ($82,47 \pm 4,59\%$) (Fig. 21).

En general, al igual que en las células animales, los incrementos en los niveles de calcio en el citosol suelen caracterizarse por una serie de elevaciones puntuales (Bauer et al., 1998, Jonhson et al., 1995, Webb et al., 1996). Cuando las plantas están obligadas a responder a estímulos ambientales, el nivel de Ca^{2+} aumenta rápidamente y de manera transitoria en el citoplasma, como consecuencia de la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular a través de canales de la membrana plasmática o de la liberación de calcio de los almacenamientos internos, como el retículo endoplásmico o las vacuolas (Sun et al., 2006). En este estudio, el rápido aumento significativo en el citosol de Ca^{2+} en las células expuestas a atrazina podría indicar que este ion actúa como un mensajero en respuesta al estrés químico. El incremento de los niveles de calcio libre citosólico en células vegetales se ha descrito recientemente como respuesta frente al diferentes tipos de estrés como la alta salinidad (Knight et al., 1997), baja temperatura (Knight et al., 1996), estrés osmótico (Taylor et al., 1996), alta temperatura (Gong et al., 1998), aluminio (Sivaguru et al., 2005) o estrés oxidativo (Price et al., 1994). Además, varios estudios mostraron un aumento intracelular de los niveles de Ca^{2+} libre citosólico en microalgas en respuesta a diferentes factores de estrés, como la falta de nitrógeno, el triclosan y el paraquat (Chen et al., 2014, González-Pleiter et al., 2017, Prado et al., 2012b). En concreto, la función de Ca^{2+} como un segundo mensajero en la respuesta celular al estrés oxidativo fue sugerida por Price et al. (1994). Por ello los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) fueron también estudiados.

La citometría de flujo (FCM), debido a la rapidez de medida, en combinación con el uso de fluorocromos específicos para determinadas especies reactivas de oxígeno, se ha revelado como el método más conveniente para caracterizar la generación de estas sustancias en la

célula. La elección del fluorocromo depende de la especie reactiva de interés, de modo que la hidroetidina (HE) refleja preferentemente el nivel de ión superóxido, mientras que la dihidrorrodamina 123 (DHR 123) se relaciona con el peróxido de hidrógeno (Walrand et al., 2003, Wilhem et al., 2009).

Los resultados obtenidos en el estudio del efecto de este herbicida, en base tanto a la tinción con HE como a la tinción con DHR 123, confirman que la atrazina induce un estrés oxidativo importante en las células de *C. reinhardtii* expuestas a una concentración subletal del herbicida. Los resultados muestran un aumento significativo en los niveles intracelulares del radical anión superóxido en los cultivos expuestos durante 3 h a 0,25 μM de atrazina ($46,95 \pm 0,83$ a.u.), con respecto a los cultivos control ($34,70 \pm 0,99$ a.u.) y en los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno en los cultivos expuestos durante 24 h a 0,25 μM de ATZ ($0,35 \pm 0,02$ a.u.), con respecto a los cultivos control ($0,19 \pm 0,02$ a.u.) (Fig. 21).

Está bien documentado que la cadena mitocondrial genera importantes cantidades de ROS durante la fosforilación oxidativa, principalmente de ión superóxido y del producto de la reducción de este ión, el peróxido de hidrógeno (Møller, 2001, Raha y Robinson, 2000, Sweetlove y Foyer, 2004). Este hecho unido a los resultados del potencial de membrana mitocondrial indica que el incremento en los niveles de estrés oxidativo observado en las células expuestas a ATZ podría ser causado por la hiperpolarización de la membrana mitocondrial además de por las alteraciones en el proceso fotosintético. Por un lado, una mayor actividad mitocondrial podría explicar una mayor producción de ROS. Por otro lado, la presencia de alteraciones en el potencial de dicha membrana puede afectar al proceso de fosforilación oxidativa. Esta alteración explicaría un incremento en la generación de ROS por la cadena respiratoria, tal y como se ha observado tanto en células vegetales como animales (Hauser et al., 2006, Lin et al., 2006, Weir et al., 2003). Otros autores han observado que las alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial conllevan a un incremento de ROS que provoca una liberación de calcio libre desde este orgánulo hacia el citosol (Kuzmin et al., 2004, Subbaiah et al., 1998, Tsuji et al., 2000). En base a esto, una potencial liberación de calcio mitocondrial como respuesta al estrés oxidativo podría estar contribuyendo al aumento registrado en los niveles de calcio citosólico observados en este estudio.

Además del potencial papel de la mitocondria en el aumento de ROS en las células microalgales, también cabe discutir la posibilidad de que la alteración detectada en el proceso fotosintético de *C. reinhardtii* expuesta a ATZ sea el origen o contribuya también al incremento detectado en los niveles de ROS en las células. Los compuestos que afectan al PSII pueden

provocar un aumento de los niveles de estrés oxidativo de las células debido a la superproducción de tripletes de clorofila (Rutherford y Krieger-Liszkay, 2001, Saladin et al., 2003). Los herbicidas tipo triazina actúan bioquímicamente desplazando la plastoquinona (PQ) de su sitio de unión (Q_B) con la proteína D1 del PSII, bloqueando así el transporte electrónico fotosintético e impidiendo el flujo de electrones de manera que éstos no alcanzan el complejo b6/f (Shehata et al., 1997). Por lo tanto, al no producirse la reducción ni de las moléculas de NADP ni del complejo citocromo b6/f, los electrones liberados desde la ferredoxina reducida pueden ser transferidos directamente al oxígeno molecular formando ión superóxido en la denominada reacción de Mehler (Mehler, 1951), el cual puede ser rápidamente convertido a peróxido de hidrógeno. El desvío de electrones hacia el oxígeno a través de esta reacción estimulada por el bloqueo de la cadena electrónica fotosintética por la acción de la atrazina explicaría la elevada producción de ROS observada en las células expuestas a este herbicida.

En resumen, tanto la alteración de la cadena de electrones fotosintética como la de la cadena de electrones respiratoria, o ambas, podrían explicar los niveles elevados de ROS detectados en las células microalgales después de 3 y 24 h de exposición a 0,25 μ M de atrazina. Además, como se comentó anteriormente, la atrazina provoca un descenso de la actividad celular en *C. reinhardtii*, los ROS generados por el mecanismo de acción del herbicida provocan desequilibrios redox y alteraciones en la regulación génica y la síntesis de proteínas que pueden conllevar a esta disminución general en la actividad celular.

Aunque los ROS siempre fueron considerados subproductos metabólicos tóxicos que en última instancia conducen a la muerte celular, hoy en día se reconoce que los ROS actúan también como mensajeros secundarios implicados en redes de señalización compartimentalizadas (Rosenwasser et al., 2014). Esta función indica que las células han desarrollado estrategias para utilizar los ROS como señales biológicas que controlan diversos programas genéticos de respuesta al estrés. Esta interpretación se basa en la suposición de que un determinado ROS puede interactuar de manera selectiva con una molécula diana que percibe el aumento de la concentración ROS, y luego traduce esta información en una modificación de la expresión génica, tales como cambios en la actividad transcripcional (Laloi et al., 2004).

Además, existen considerables evidencias de que el estrés oxidativo juega un papel en la senescencia en las plantas (Sohal, 2002). Se ha formulado la hipótesis de que un desequilibrio entre la generación de ROS, la protección antioxidante y la reparación del daño oxidativo puede conducir a la senescencia (Beckman y Ames, 1998).

En el presente estudio, una acumulación de ROS fue detectada en las células microalgales tras 3 y 24 h de exposición a ATZ. Varios estudios ecotoxicológicos también han reportado la formación de ROS en algas unicelulares expuestas a atrazina (Qian et al., 2009, Mofeed y Mosleh, 2013), paraquat (Esperanza et al., 2015, Jamers et al., 2009, Nestler et al., 2012, Prado et al., 2012a, Prado et al., 2012b) y metales (Melegari et al., 2013, Perreault et al., 2012).

En las algas, el exceso de ROS puede afectar muchas funciones celulares a través de la modificación de los ácidos nucleicos, oxidación de proteínas, deterioro de las clorofilas y la inducción de la peroxidación lipídica (Ledford y Niyogi, 2005, Mittler et al., 2004, Vavilala et al., 2016). Particularmente, el malondialdehído (MDA) es uno de productos finales de bajo peso molecular formados por la descomposición de hidroperóxidos primarios y polímeros de lípidos (Gill y Tuteja, 2010). La medición del nivel MDA se utiliza de manera rutinaria como índice de peroxidación de lípidos en algas y se ha documentado para varias microalgas expuestas a diferentes condiciones de estrés, tales como altas temperaturas (Vavilin et al., 1998), exposición a una amplia gama de elementos traza (Li et al., 2006) y exposición a contaminantes orgánicos (Elbaz et al., 2010, Li et al. 2009, Sanchez et al., 2015). Al contrario de lo esperado, los niveles de MDA disminuyeron un 5%, de manera no significativa, en los cultivos expuestos durante 24 h a ATZ con respecto a los cultivos control (Fig. 21). Los resultados de MDA no indicaron peroxidación lipídica en las membranas celulares microalgales después de la exposición a la atrazina, sin embargo los análisis por FCM mostraron un incremento de ROS, como ya se ha mencionado. Aunque las medidas de las respuestas funcionales de células individuales por FCM parecen ser más sensibles que el análisis mediante espectrofotometría de poblaciones enteras, esta ausencia de peroxidación lipídica puede sugerir también la activación de vacuolas autofágicas que reciclan material dañado y/o la activación de enzimas antioxidantes, como veremos más adelante.

La sobreproducción de ROS en células se relaciona a menudo con daños inespecíficos de los componentes celulares, conduciendo a una interrupción de procesos metabólicos cruciales (Mittler, 2002, Vega et al., 2006). Para evitar que la perturbación del metabolismo, la célula activa un conjunto de mecanismos protectores. Entre ellos, la inducción de enzimas antioxidantes juega un papel prominente (Mittler, 2002, Pokora y Tukaj, 2010). En el presente estudio, la respuesta transcripcional de genes relacionados con el estrés oxidativo se midió mediante RT-qPCR. Los resultados indican un incremento significativo ($p \leq 0,05$) en los cultivos expuestos a atrazina durante 24 h de la transcripción de *APX* (ascorbato peroxidasa) y *GST* (glutación S-transferasa) y un descenso significativo ($p \leq 0,05$) de los niveles de *CAT* (catalasa),

SOD (Mn-superóxido dismutasa) y GPX (glutati6n peroxidasa), con respecto a los cultivos control (Fig. 21).

En las plantas superiores, CAT y APX I son consideradas las enzimas m1s importantes que pueden regular los niveles de per6xido de hidr6geno intracelular, es decir, llevan a cabo la transformaci6n de H₂O₂ a H₂O (Livingstone, 2001, Nakano y Asada, 1981). En el presente estudio, la transcripci6n de APX I aument6 significativamente ($p \leq 0,05$) en los cultivos expuestos durante 24 h ($161,51 \pm 1,78\%$) con respecto a los cultivos control, mientras que la transcripci6n de CAT disminuy6 significativamente ($62,30 \pm 2,96\%$, $p \leq 0,05$). Estos resultados se correlacionan con los an1lisis espectrofotom6tricos donde tambi6n se observ6 una disminuci6n significativa ($p \leq 0,05$) en la actividad de CAT ($51,26 \pm 2,24\%$), con respecto a los cultivos control.

CAT est1 localizada principalmente en el peroxisoma y es responsable de la protecci6n contra la oxidaci6n de 1cidos grasos no saturados en la membrana de la c6lula. Adem1s de participar en la destoxificaci6n del per6xido de hidr6geno, tambi6n es capaz de catalizar ciertas reacciones de peroxidaci6n en presencia de H₂O₂, actuando sobre algunos alcoholes, aldehidos y 1cidos org1nicos como sustratos. Se ha descrito como una enzima indispensable para la destoxificaci6n de las ROS generadas en situaciones de estr6s (Garg y Manchanda, 2009). APX es una enzima involucrada en el ciclo ascorbato-glutati6n en el cloroplasto, mitocondrias y peroxisomas (del R1o et al., 2006). La APX representa un mecanismo importante de eliminaci6n de H₂O₂ utilizando como sustrato el ascorbato (ASC). Esta enzima cataliza la transformaci6n del H₂O₂ en H₂O mediante la oxidaci6n del ASC a monodehidroascorbato (MDA). La APX junto con otro grupo de enzimas como la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutati6n reductasa (GR), el ASC y el glutati6n reducido (GSH), forma parte del ciclo del ascorbato-glutati6n o ciclo de Halliwell-Asada-Foyer (Smirnoff, 2000) (Fig. 21) y est1n implicados en la destoxificaci6n de H₂O₂ (De Gara y Tommasi, 1999, Noctor y Foyer, 1998) principalmente en aquellos compartimentos celulares donde no existe CAT, como el citosol, las mitocondrias y los cloroplastos. Un alto nivel end6geno de ascorbato peroxidasa es esencial para mantener el sistema antioxidante que protege a las plantas del da1o oxidativo (Shigeoka et al., 2002).

GST, GPX y SOD son enzimas principales que intervienen en el sistema de defensa antioxidante celular. Por un lado, la funci6n bioqu1mica de GPX es reducir l1pidos hidroper6xidos a sus correspondientes alcoholes (OH⁻) y reducir tambi6n H₂O₂ libre a H₂O (Chance et al., 1979, Epp et al., 1983). Una de las reacciones llevadas a cabo por la GPX es la

detoxificación del H_2O_2 utilizando el glutatión reducido (GSH) para formar glutatión oxidado (GSSG) y agua. La glutatión reductasa utiliza el NADPH para reducir el glutatión oxidado formándose de nuevo GSH y $NADP^+$. La mayor parte de la actividad de esta enzima se encuentra en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondrial. Por otro lado, GST es conocida por su capacidad de unirse a las toxinas y su función en el transporte de proteínas (Udomsinprasert et al., 2005), ambos son procesos importantes en los procesos de detoxificación en el interior de las células. Las glutatión S-transferasas catalizan la conjugación del grupo-SH del glutatión sobre substratos xenobióticos. Esta enzima está implicada en una serie de procesos fisiológicos como la regulación hormonal, captación de antocianinas en vacuolas, metabolismo de la tirosina, regulación de la apoptosis y en la respuesta de las plantas a estreses bióticos y abióticos (Dixon et al., 2010). Cabe destacar el papel de las GSTs en la conjugación de compuestos tóxicos tales como los herbicidas al GSH, transformándolos en compuestos menos tóxicos de esta forma se previene el daño oxidativo que pueden ocasionar los herbicidas a biomoléculas tales como proteínas, DNA y RNA (Cole, 1994, Knörzer et al., 1996). Además se ha observado la versatilidad que poseen las GSTs para actuar como peroxidasas, reduciendo compuestos orgánicos como los hidroxiperoxilos formados tras la peroxidación lipídica de membranas a consecuencia del daño oxidativo, causado por los herbicidas, en productos con menor potencial citotóxico (Dixon et al., 1998, Roxas et al., 1997). Algunas GSTs a través de su acción como peroxidasas reducen el ASC a partir de la forma DHA (Ácido dehidroascórbico) o en el catabolismo de las tirosinas (Thom et al., 2001).

En el presente estudio, se observó un aumento significativo ($p \leq 0,05$) en la abundancia de la transcripción relativa de *GST* ($159,10 \pm 10,44\%$) en los cultivos expuestos durante 24 h con respecto al control. Sin embargo, se observó una disminución significativa en la abundancia de transcripción relativa de *GPX* ($73,40 \pm 3,01\%$) y en *SOD* ($80,85 \pm 5,28\%$).

Dentro de las células, SOD constituye la primera línea de defensa que cataliza la reacción de conversión del superóxido (O_2^-) en O_2 y H_2O_2 (Fridovich, 1978, McCord, 1974, McCord y Fridovich, 1988), este H_2O_2 es luego utilizado como sustrato por CAT y APX (Aksmann et al., 2014, Asada, 2006). La superóxido dismutasa pertenece a la familia de antioxidantes más ampliamente distribuida en la naturaleza. Su actividad fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich (McCord y Fridovich, 1988). En situaciones de estrés el radical superóxido se produce en elevadas concentraciones, la SOD, enzima clave en el sistema de defensa frente a los ROS, elimina el radical superóxido evitando de esta forma la formación de otras especies más reactivas del oxígeno como son el radical hidroxilo o el

oxígeno singlete, los cuales presentan una reactividad mayor y cuyos mecanismos destoxicadores para eliminarlos aún no han sido identificados. Se ha descrito un incremento en la producción de SOD en plantas en situación de estrés oxidativo generado por diversos factores abióticos fotodinámicos, térmicos, daños por ozono, herbicidas, sequía, anoxia y factores bióticos como patógenos (Apel y Hirt, 2004).

Contrariamente a la hipótesis inicial, la abundancia relativa de la transcripción de SOD disminuyó mientras que se incremento la producción de H₂O₂ en los cultivos expuestos a atrazina, como se comentó anteriormente. Hay varias explicaciones posibles para esto. En primer lugar, la familia de las superóxido dismutasas está formada por metaloisoenzimas que se distinguen por su cofactor metálico, en plantas se distinguen 3 isoformas (CuZn-SOD, Fe-SOD y Mn-SOD) que también se han encontrado en microalgas (Janknegt et al., 2009, Kanematsu et al., 2010, Zbigniew y Wojciech, 2006). En este trabajo, se analizó la transcripción de una de estas isoformas de SOD, la manganeso superóxido dismutasa, y se observó una disminución después de la exposición a atrazina, pero las otras isoformas de esta enzima podrían estar sobreexpresadas y esto podría explicar la sobreproducción de peróxido de hidrógeno detectada en este trabajo. Por otra parte, el aumento en los niveles ROS intracelulares no está siempre relacionado con una sobreexpresión de genes relacionados con la actividad antioxidante. Por ejemplo, González-Pleiter et al. (2017) y Sanchez et al. (2015) observaron un aumento en la producción de ROS en las células de *C. reinhardtii* expuestas a triclosán y C10-PFPA, respectivamente; sin embargo la actividad SOD también disminuyó en ambos estudios. Janknegt et al. (2009) también encontraron una disminución en la actividad SOD en algunas especies de microalgas en respuesta a una alta irradiancia. En otros estudios, el cobre no alteró la actividad SOD en *C. kessleri* (Sabatini et al., 2009), ni el zinc en *P. viridis* (Li et al., 2006), ni tampoco el cloro en *C. ehrenbergii* (Sathasivam et al., 2016). Por último cabe mencionar que hay más mecanismos de producción de H₂O₂. Una posible explicación al aumento del peróxido de hidrógeno observado en este trabajo sería que la inhibición de la fotosíntesis puede conducir a la activación del mecanismo heterotrófico en las células microalgales para conseguir energía y así poder mantener su viabilidad. Este cambio en el metabolismo podría provocar un aumento en la tasa de fotorespiración, llevando a la producción de peróxido de hidrógeno en los peroxisomas microalgales (Cirulis et al., 2013).

La modificación de la expresión de genes con actividad antioxidante observada, ya sea un aumento (*GST* y *APX I*) o una disminución (*CAT*, *GPX* y *SOD-1*), sugiere un versátil y flexible sistema antioxidante que intenta controlar los niveles óptimos de ROS, pero en este trabajo parece que el sistema de destoxicación celular no es eficaz ya que se observa una

sobreproducción intracelular de especies reactivas de oxígeno (Fig. 21). Además, la transcripción de un gen debe reflejarse en cambios traduccionales para conducir en última instancia a productos proteicos funcionales (Sanchez et al., 2015). Investigar tales cambios en la traducción son necesarios en futuros estudios para comprender mejor la respuesta antioxidante en las microalgas.

Por todo lo anteriormente comentado, los resultados obtenidos nos proporcionan una valiosa información sobre el mecanismo de toxicidad de la ATZ y las respuestas desencadenadas en las células microalgales. Para completar el estudio se analizó mediante RNA-Seq los genes que se expresan diferencialmente a las 3 y 24 h. Los resultados de RNA-Seq mostraron 12 genes diferencialmente expresados con respecto al control ($FDR \leq 0,01$ y $LFC \geq 1$ o ≤ -1), que se repiten tanto a las 3 como a las 24 h, 11 genes están sobreexpresados, 4 pertenecen a la categoría de aminoácidos y están relacionados con el catabolismo de aminoácidos (*MCCA*, *AAH1*, *GDH2*, *CLR21*), 4 pertenecen a la categoría de energía (*ICL1*, *PCK1B*, *ETFA*, *ETFB*), 1 a la de metabolismo (*RHP-2*), 1 a la de especies reactivas de oxígeno y estrés (*GOX9*) y 1 a expresión génica (*FKB16-1*). Solamente 1 gen aparece subexpresado con respecto a los cultivos control y pertenece a la categoría de Redox (*NIT1*).

Los datos transcriptómicos se correlacionan bien con los datos obtenidos mediante citometría de flujo. En general, los datos de RNA-Seq mostraron mayor abundancia de los transcritos relacionados con la generación de energía heterótrofa y la disposición de electrones. Estos resultados se relacionan con los obtenidos en los estudios de potencial de membrana citoplasmática por FCM ya que este parámetro proporciona información sobre el estado actual del transporte y la energía de la célula (Konrad y Hedrich, 2008). En el presente trabajo, se observaron una disminución significativa en la actividad celular y un despolarización de la membrana plasmática en las células de *C. reinhardtii*, expuestas a una concentración de atrazina subletal. Como ya se comentó anteriormente, la membrana plasmática es la barrera quimiosmótica que proporciona una interfaz entre el organismo y su medio externo. A través de esta bicapa de fosfolípidos, un potencial transmembrana electroquímico (negativo en el interior celular) juega un papel fundamental en el control de intercambio de solutos, con la implicación de gradientes entre las concentraciones intracelulares y extracelulares de una variedad de iones. Es un desequilibrio de energía requerido cuyo mantenimiento depende de la acción de diferentes canales y bombas (Lloyd et al., 2004). Por esta razón, las células de *C. reinhardtii* bajo condiciones de estrés requieren todos los almacenes de energía para la preservación de su potencial de membrana citoplasmática, viabilidad y homeostasis celular.

Los datos de FCM también mostraron un aumento en el potencial de membrana mitocondrial, dicho aumento puede ser interpretado como una estimulación de la actividad mitocondrial y los datos podrían apoyar la hipótesis de que otra fuente importante de energía para las células microalgales pueda proceder de la respiración (Loseva et al., 2004). Como se mencionó anteriormente, los genes *ETFA* y *ETFB*, implicados en el transporte de electrones respiratorio de las mitocondrias aparecieron sobreexpresados. Las células pueden usar electrones derivados de diversas vías catabólicas, tales como la degradación de los aminoácidos, para generación de energía respiratoria. Las células de *C. reinhardtii* parecen cambiar su metabolismo fotosintético por uno heterótrofo bajo condiciones de estrés producidas por la atrazina y la sobreproducción de ROS. El herbicida ejerce su mecanismo de acción en el PSII (Marchetti et al., 2013, Rutherford y Krieger-Liszkay, 2001), lo que reduce la actividad fotosintética, como se ha comentado anteriormente, y debido a esta razón las microalgas tratan de obtener energía a través del metabolismo heterotrófico para poder mantener su viabilidad.

La acumulación inicial de transcritos que codifican para enzimas y proteínas relacionadas con el catabolismo de aminoácidos sugiere que *C. reinhardtii* recurre en primer lugar a rutas de degradación de aminoácidos para obtener energía, cuando el proceso de fotosíntesis se ve afectada (Hemschemeier, 2013). Varios estudios han demostrado que en especies de microalgas como *C. reinhardtii* y *Chlorella vulgaris*, los aminoácidos glucogénicos pueden ser convertidos en glucosa a través de la gluconeogénesis y aminoácidos cetogénicos pueden ser transformados en cuerpos cetónicos a través de cetogénesis y su degradación produce acetil-CoA (Ahii et al., 2015, Johnson y Alric, 2013). Estos cuerpos cetónicos son producidos para ser utilizados como energía.

También, como resultado del catabolismo de aminoácidos, se produce gran cantidad de amonio y este amonio debe ser excretado para el mantenimiento del equilibrio osmótico de la célula. La inducción del transporte de amonio fue indicada por el aumento en la cantidad de la transcripción de *RHP-2*, puesto que codifica una proteína Rh implicada en el transporte transmembrana de amonio/CO₂ (Soupene et al., 2004). Por otra parte, con respecto al metabolismo del nitrógeno, *NIT1* mostró una reducción de la transcripción en cultivos expuestos a atrazina. *NIT1* codifica una nitrato reductasa, que cataliza el primer paso de la asimilación de nitrato. El nitrato se reduce a nitrito por la nitrato reductasa y luego la nitrito reductasa cataliza su reducción a amonio. La expresión de *NIT1* es reprimida por amonio e inducida por la falta de amonio (de Montaigu et al., 2010). La disminución de la actividad de la nitrato reductasa fue observada en células de *C. moewusii* expuestos al paraquat (Prado et al., 2009b) de una manera dependiente de la concentración, también se obtuvieron resultados

similares en *C. reinhardtii* expuesta a atrazina (Fernández-Naveira et al., 2016). El descenso en la expresión de genes que controlan la asimilación de nitrógeno también se ha observado con la exposición a metales pesados y a atrazina en la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* (Qian et al., 2012). La asimilación de nitrógeno y la fijación de carbono son procesos altamente coordinados en las algas unicelulares. Por ello un herbicida que finalmente interfiere en la fijación de carbono fotosintético también interfiere en las actividades enzimáticas de la asimilación de nitrógeno (Prado et al., 2009b).

En resumen, la concentración subletal de ATZ de 0,25 μ M modifica el estado energético de las células de *C. reinhardtii*. Los resultados obtenidos mostraron cambios en los cultivos expuestos a atrazina con respecto a los cultivos control como: disminución de la actividad celular, despolarización de la membrana plasmática, hiperpolarización de la membrana mitocondrial, disminución de la fluorescencia de la clorofila *a*, reducción en el contenido de pigmentos celulares, aumento en los niveles intracelulares de ROS y de Ca^{2+} y cambios en la expresión de genes relacionados con la actividad antioxidante celular (Fig. 21). Por otro lado, el análisis transcriptómico realizado tras 3 h de exposición nos ayuda a avanzar en la comprensión de los ajustes fotosintéticos que se producen durante la exposición al herbicida. La inhibición de la fotosíntesis inducida por la toxicidad de la atrazina afecta al estado fisiológico y bioquímico de las células microalgales. Además, el perfil proteico también fue alterado por el estrés producido por la exposición a ATZ. Finalmente, el análisis de RNA-Seq tras 3 y 24 h de exposición al herbicida indica una alteración en el estado energético celular, los datos transcriptómicos revelan una mayor abundancia de transcritos relacionados con la generación heterotrófica de energía y la disposición de electrones en las células estresadas (Fig. 21).

Teniendo en cuenta estos resultados, el aumento de algunos contaminantes en los sistemas acuáticos podría conducir a una disminución dramática en la fijación del CO_2 a nivel mundial.

Después de todas las alteraciones fisiológicas y bioquímicas observadas en las células microalgales expuestas a ATZ es importante estudiar diferentes parámetros relacionados con la senescencia celular, debido a que la acumulación de daños a través del ciclo de vida conlleva al deterioro de componentes y al mal funcionamiento de la célula provocando fenómenos de senescencia celular que pueden conducir a la muerte celular (Campisi, 2007). En los ecosistemas naturales, las microalgas tienen que adaptarse a las condiciones ambientales heterogéneas y a la escasez de nutrientes, lo que desencadena fenómenos de senescencia

celular o muerte celular programada (PCD). Este fenómeno es análogo al que ocurre en los cultivos microalgales que crecen en sistemas cerrados (cultivo en *Batch*) en condiciones de laboratorio (Humby et al., 2013). El crecimiento de los cultivos se caracteriza por tener una fase logarítmica, donde hay suficientes nutrientes que permiten altos ratios de crecimiento, a continuación los nutrientes empiezan a agotarse, la división celular cesa y el número de células se mantiene, los cultivos están en fase estacionaria y las células entran en senescencia celular, donde se interrumpe el ciclo celular para evitar la proliferación de células dañadas (Franklin et al., 2006, White y Lowe, 2009). Durante esta fase las células experimentan cambios estructurales y metabólicos (Fogg y Thake, 1987, Wanner y Egli, 1990). Incluso si nuevos nutrientes se añaden en el medio muchas células no serán capaces de volver a su estado de crecimiento, el proceso de senescencia no será reversible y las células morirán (Franklin y Berges, 2004, Fredriksson y Nyström, 2006).

Por todo lo anteriormente expuesto, la respuesta de la microalga del agua dulce *C. reinhardtii* expuesta a una concentración subletal del herbicida (0,25 μ M) durante 24 h y cultivos no expuestos en fase estacionaria a las 96 h fueron estudiados para investigar el efecto de un producto químico (herbicida) y de una limitación de nutrientes sobre el proceso de senescencia celular.

La muerte celular programada (PCD) es un proceso celular que puede ocurrir en respuesta a diversos factores desfavorables, bióticos o abióticos. La PCD puede ser de gran importancia ecológica en algas unicelulares, ya que puede garantizar la supervivencia de la población bajo condiciones ambientales desfavorables (Darehshouri et al., 2008). Varios procesos de PCD están mediados por un conjunto de enzimas llamadas caspasas, proteínas pertenecientes al grupo de las cisteín-proteasas, que son clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por una diversidad de estímulos. Estas enzimas tienen la característica inusual de romper cadenas de péptido después de residuo de aspartato. Se encuentran en la célula como precursores inactivos que necesitan ser cortados para iniciar su actividad. Existen dos grandes grupos de caspasas, las denominadas iniciadoras y las ejecutoras. Las caspasas iniciadoras son activadas por autoproteólisis cuando son translocadas a compartimientos específicos o mediante adaptadores/activadores. Las caspasas ejecutoras son activadas mediante el corte específico mediado por las caspasas iniciadoras. En humanos las caspasas 3 y 7 han sido descritas como las principales caspasas ejecutoras, ya que se caracterizan por una actividad altamente específica en comparación con el resto de caspasas conocidas hasta ahora (Ledvina et al., 2017, Van Aken, 2015). En la microalga verde *Chlorella saccharophila*, la caspasa 3 desencadena una serie de eventos claves en la PCD, de

forma que su inhibición disminuye en gran medida esta respuesta celular programada genéticamente (Bidle, 2016, Vacca et al., 2004, Vanacker et al., 2006, Zuppini et al., 2006). Estas proteasas son las encargadas de los cortes finales de substratos que provocan la morfología típica de la apoptosis. Entre estos substratos se encuentran proteínas de señal, de reparación de DNA, estructurales, factores de transcripción, etc.

La PCD dependiente de la activación de la cascada de caspasas es regulada por dos caminos (Elmore, 2007), la cascada generada por los receptores de membrana (vía extrínseca) y la cascada desencadenada por cambios en la integridad de la mitocondria (vía intrínseca) (Van Loo et al., 2002), ambas vías convergen con la activación de las caspasas. En este estudio, un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de la actividad caspasa 3/7 analizada mediante FCM se observó en los cultivos expuestos a ATZ durante 24 h ($113,60 \pm 4,59\%$) y en los cultivos en fase estacionarias a las 96 h ($126,23 \pm 3,85\%$) con respecto a los cultivos control a las 24 h (Fig. 21). Estas enzimas están implicadas en la activación de la DNAsa activada por caspasas lo que conlleva posteriormente a la generación de la fragmentación oligonucleosomal del DNA (Sprick y Walczak, 2004). Aunque el ensayo de la actividad caspasa 3/7 fue realizado utilizando un *kit* diseñado de manera específica para las caspasas de mamíferos, incrementos en esta actividad caspasa asociada con fenómenos de muerte celular han sido reportados en una variedad de especies de microalgas expuestas a condiciones de estrés (Affenzeller et al., 2009, Darehshouri et al., 2008, González-Pleiter et al., 2017).

Dado que la toxicidad de la ATZ se ejerce fundamentalmente vía estrés oxidativo y dado que el DNA de la célula es una de las principales biomoléculas que resultan afectadas por este tipo de estrés (Valavanidis et al., 2006, Wang et al., 2008), uno de los parámetros a tener en cuenta a la hora de catalogar la toxicidad de este herbicida es precisamente el potencial daño que puede ejercer sobre el DNA celular.

Además, se ha demostrado que diversos compuestos presentes en las aguas contaminadas son capaces de interactuar con el DNA de las células y causar efectos genotóxicos (Galloway et al., 2002, Mouchet et al., 2007). De este modo, la determinación del potencial genotóxico de los diferentes compuestos que contaminan las aguas superficiales es uno de los principales objetivos dentro del campo de la monitorización ambiental para el control de la contaminación.

Existen numerosas técnicas para la detección de daños en el DNA, que se han venido utilizando para identificar sustancias con actividad genotóxica. Dentro de ellas, en este trabajo se han empleado la tinción con el fluorocromo DAPI y la observación al microscopio de

fluorescencia. En este estudio se ha observado un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de células DAPI-positivas en los cultivos expuestos al herbicida durante 24 h y en los cultivos con limitación de nutrientes en fase estacionaria a las 96 h ($146,60 \pm 10,10\%$ y $163,79 \pm 11,77\%$, respectivamente), con los núcleos teñidos con una intensa fluorescencia, con respecto a los cultivos control en fase logarítmica. Los resultados obtenidos muestran que la activación de las caspasas puede estar relacionada con los cambios morfológicos que muestran los núcleos de las células *C. reinhardtii* (Fig. 21).

Varios autores han relacionado estos cambios en la morfología nuclear en plantas y microalgas con la condensación de la cromatina, que se describe con frecuencia como un marcador de apoptosis (Darehshouri et al., 2008, Elmore, 2007, Ferradás et al., 2014, Giri et al., 2013, Jiménez et al., 2009, Zuppini et al., 2009, Zuppini et al., 2010). En relación con esto, las células de *C. reinhardtii* expuestas a atrazina durante 24 h presentan una tinción irregular empleando DAPI con un grado leve de cromatina aglomerada en los núcleos. El DAPI se une estequiométricamente al DNA, es decir, un aumento de la fluorescencia del fluorocromo está relacionado exclusivamente con el contenido de DNA celular. En el presente estudio, en células DAPI-positivas, la acumulación de cromatina no fue sólo restringida a la zona nuclear, los gránulos teñidos de azul también fueron observados en el centro de la célula. Estas observaciones sugieren algún grado de cariólisis (Jiménez et al., 2009). Esperanza et al. (2015) observaron que un conocido herbicida prooxidante (paraquat) también provoca alteraciones morfológicas nucleares similares en células de *C. reinhardtii* apoyando nuevamente el papel central de la generación de ROS como un desencadenante de las alteraciones relacionadas con el PCD en las células microalgales.

Por otro lado, la autofagia se ha asociado con fenómenos de muerte celular, pero es un proceso catabólico que implica la degradación de proteínas, lípidos y orgánulos del citoplasma que son secuestrados en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas. Estas vesículas se fusionan con vacuolas liberando la vesícula interna, llamada cuerpo autofágico, en el lumen. Este cuerpo autofágico es finalmente degradado por hidrolasas para la descomposición y reciclaje de los productos de degradación de bajo peso molecular (Cebollero y González, 2007). Aparentemente este proceso tiene dos funciones: salvar a la célula de la muerte como ocurre bajo limitación de nutrientes y ser un mecanismo por el cual la célula degrada o moviliza sus constituyentes antes de la muerte (Van Doorn y Woltering, 2005). Este fenómeno se ha descrito en células de *Chlamydomonas* expuestas a un antibiótico (Crespo et al., 2005) y en *Chlorella vulgaris* expuesta a un herbicida (Rioboo, 2008). En nuestro estudio, el hecho de que las células expuestas al herbicida durante 24 h presenten niveles de viabilidad

cercanos al 100% parece indicar que la presencia de la autofagia estaría relacionada con la función de salvar a la célula de la muerte. Para analizar la presencia de vacuolas autofágicas se ha empleado el fluorocromo MDC que se une específicamente a los autofagosomas (Contento et al., 2005, Xiong et al., 2007) y la observación al microscopio de fluorescencia. Un incremento significativo ($p \leq 0,05$) del número de células MDC-positivas fue observado en las algas expuestas durante un período corto a atrazina ($134,97 \pm 2,31\%$) y en células en fase estacionaria ($136,70 \pm 0,57\%$) con respecto a los cultivos control en fase log a las 24 h. Los resultados de los parámetros relacionados con los procesos de senescencia como: la activación de la actividad caspasa, las lesiones en el DNA en los núcleos de *C. reinhardtii* y la presencia de autofagosomas en las células expuestas a ATZ sugieren que la exposición a corto plazo a este herbicida provoca una senescencia celular en la microalga (Fig. 21).

Se ha comprobado que este mecanismo degradativo es esencial para la adaptación de la célula a factores de estrés internos y externos. En las células vegetales, la autofagia está inducida por estímulos extracelulares e intracelulares como la limitación por nutrientes, estrés oxidativo, infección por patógenos u orgánulos dañados (Liu et al., 2007). La autofagia también puede ser inducida por alteraciones en los sistemas de obtención de energía en las células vegetales ayudando a mantener la viabilidad. En las células de *Arabidopsis* y *Sacharomyces cerevisiae*, bajo limitación de carbono, nitrógeno y otros nutrientes, las células que presentan autofagia mantienen su viabilidad, posiblemente porque los constituyentes citoplasmáticos degradados son utilizados como fuente de nutrientes necesarios (Hanaoka et al., 2002, Heitman et al., 1991). En el caso de las células de *C. reinhardtii* expuestas a atrazina, la estrategia parece ser similar, al no ser capaces de cubrir sus necesidades metabólicas y energéticas a través de la fotosíntesis, se frena el crecimiento, y las células pasan a un metabolismo heterotrófico para la producción de energía que también puede ser ayudado por los nutrientes obtenidos por autofagia.

Otro indicio de que la autofagia en *C. reinhardtii* es un mecanismo de supervivencia durante los procesos de limitación de nutrientes o de energía bajo condiciones desfavorables como la exposición a un herbicida, es que las mitocondrias siguen activas, como ya se ha mencionado anteriormente, además de mantenerse también la integridad de la membrana plasmática. Este fenómeno ya fue descrito por Leu y Hsu (2005), quienes observaron que las células de *Chlorella* mantenían su integridad de membrana plasmática incluso después de perder completamente las clorofilas y la mayoría de su DNA. Teniendo en cuenta que la fotosíntesis está inhibida por la presencia de la atrazina, tal y como se comentó anteriormente, para llevar a cabo estos procesos la célula necesita energía; la presencia de mitocondrias no

dañadas en los cultivos expuestos refuerza la hipótesis de que estos orgánulos se mantengan activos como únicos centros productores de energía.

Otros autores han propuesto que las vacuolas ayudan a regular la respuesta de las células vegetales a diferentes tipos de estrés (Jiang et al., 2007). Las vacuolas son el principal compartimento de reciclaje de aminoácidos de las células vegetales, función íntimamente relacionada con la respuesta a estrés ambiental (Müntz, 2007). Está ampliamente documentado que la vacuola de las células vegetales participa en la detoxificación y excreción de diversos compuestos endógenos y exógenos que son dañinos para el metabolismo celular, participando en las respuestas de defensa ante condiciones de estrés (Andreev, 2001). La presencia de vesículas autofágicas en las células microalgales expuestas a atrazina indica un metabolismo activo. Por un lado, el tráfico de vesículas hacia la membrana plasmática es crucial para la viabilidad celular, ya que dicha membrana es de las más expuestas al estrés. Por otro lado, los principales componentes de la membrana como lípidos y proteínas son constantemente reciclados, lo que proporciona un mecanismo para el reajuste continuo de la composición de la membrana (Levine, 2002) y podría explicar por lo tanto la ausencia de peroxidación lipídica observada en este trabajo (Fig. 21).

Solapamientos entre los procesos de PCD fueron detectados en este estudio, como la actividad caspasa, típica característica de apoptosis y la presencia de autofagosomas, típica característica de la autofagia. Varios estudios han afirmado que los dos son totalmente sincrónicos y finalmente conllevan la muerte celular (van Doorn y Woltering, 2004). En los últimos años, muchos investigadores han señalado la aparición de PCD en algas unicelulares (Franklin et al., 2006, Pérez-Pérez et al., 2010, Pérez-Pérez et al., 2012). En concreto varios estudios de PCD se han llevado a cabo con *C. reinhardtii* expuesta a diversos estímulos, como el ácido acético (Zuo et al., 2012), la exposición a la luz ultravioleta C (UV-C) (Moharikar et al., 2006, 2007), el calor (Durand et al., 2011, Nedelcu, 2006) y el mastoparan (Yordanova et al., 2013).

Además los resultados de los niveles intracelulares de calcio, anteriormente comentados, sugieren que este ión puede actuar como un mensajero transitorio en la transducción de señales en las células de *C. reinhardtii* expuestas a condiciones de estrés, ya que el aumento se detecta después de la exposición a corto plazo a la ATZ. Por otro lado, ambos tratamientos experimentales (atrazina y falta de nutrientes), provocan un incremento en la generación de ROS, sugiriendo que el mecanismo de acción común entre los dos tratamientos (químico e inanición) puede ser el estrés oxidativo. Este incremento intracelular de los niveles de ROS

podría estar relacionado con la aparición de marcadores típicos de PCD en ambos tratamientos experimentales, al igual que el descenso en la actividad fotosintética y los cambios observados en el potencial membrana mitocondrial (Fig. 21), cambios en dicho potencial han sido descritos como buenos marcadores de PCD en plantas expuestas a diferentes estímulos (Yao et al. 2004, Zhang y Xing, 2008) y en microalgas (Vavilala et al., 2015).

Cabe decir también que la utilización del término senescencia en microalgas es controvertido, pues el proceso de envejecer es difícil de definir en los organismos unicelulares. La senescencia ha sido usada a menudo para referirse a la apariencia de las células después de un crecimiento exponencial, es decir, cuando muchas células están probablemente muertas a causa de una muerte natural (Franklin et al., 2006). En el presente trabajo, la aparición de varios marcadores de PCD se ha reportado en células de *C. reinhardtii* después de una exposición a corto plazo a la atrazina, así como en células con limitación de nutrientes. En este sentido, la senescencia en algas podría ser funcionalmente equivalente a la senescencia en organismos multicelulares, como las plantas (controlada por vía PCD), con expresión de proteasas y lisis celular que ocurren con el fin de cumplir un papel funcional en las poblaciones naturales (Franklin et al., 2006).

En resumen, las microalgas son conocidas por ser sensibles a los productos químicos y, debido a su corto ciclo de vida, proporcionan a menudo una de las primeras señales de los impactos en los ecosistemas. Su producción primaria y sus funciones esenciales en el ciclo del nitrógeno y el fósforo son críticos para los ecosistemas acuáticos. Alteraciones moleculares y celulares reportados en el presente trabajo sugieren que la exposición a sustancias químicas, tales como la atrazina, inducen la sobreproducción de ROS, además de cambios fisiológicos y bioquímicos, que conducen a la aparición de senescencia celular en las poblaciones microalgales, esto podría poner en peligro la biodiversidad, estructura y función de los niveles tróficos más altos de los ecosistemas de agua dulce.

En cuanto a los parámetros analizados en este estudio que se han visto alterados por la exposición a ATZ, todos ellos aportan una extensa y valiosa información sobre los mecanismos de toxicidad del herbicida así como sobre las respuestas desencadenadas en *C. reinhardtii*. Además, en su conjunto, justifican la utilización de esta microalga como modelo biológico sensible en estudios de ecotoxicología. Cabe decir, que los parámetros analizados por citometría de flujo (FCM) son una buena alternativa a los estudios poblacionales tradicionales permitiendo una rápida y sensible medición cuantitativa de las respuestas de las células individuales al estrés provocado por la exposición una sustancia tóxica. El análisis realizado en

células enteras presenta como ventaja que se pueden detectar toda una serie de reacciones complejas que sólo pueden existir en una célula intacta metabólicamente activa. Todo esto avala su aplicación como biomarcadores en biosensayos de toxicidad.

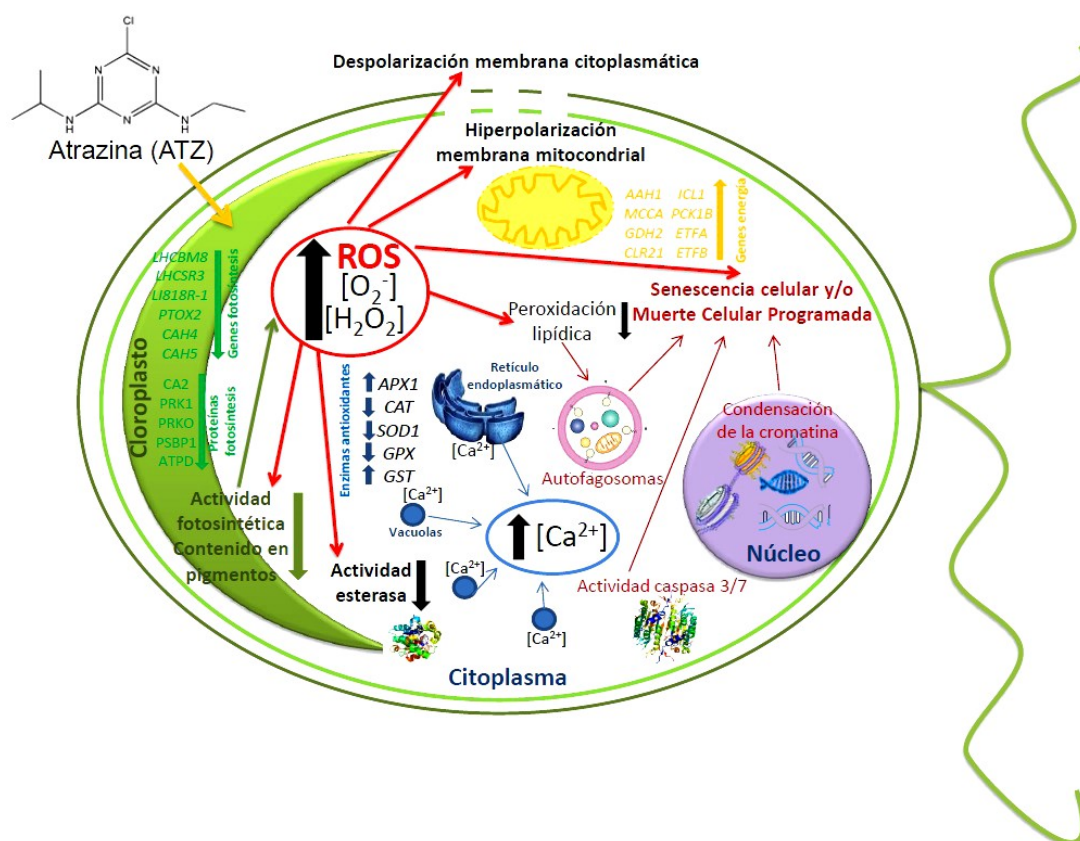


Figura 21. Esquema del mecanismo de acción del herbicida atrazina sobre la microalga *C. reinhardtii*. La atrazina afecta a diversos procesos celulares a través de vías de señalización mediadas por Ca^{2+} y especies reactivas de oxígeno (O_2^- y H_2O_2). Estos procesos celulares incluyen disminución de la actividad celular, despolarización de la membrana plasmática, hiperpolarización de la membrana mitocondrial, disminución de la actividad fotosintética, reducción en el contenido de pigmentos celulares y cambios en la expresión de genes relacionados con la actividad antioxidante celular. Además genes y proteínas relacionados con la fotosíntesis aparecen subexpresados, mientras que los relacionados con la generación de energía heterotrófica y la disposición de electrones aparecen sobreexpresados. Por último, el incremento intracelular de los niveles de ROS podría estar relacionado con la aparición de marcadores típicos de muerte celular programada como la presencia de autofagosomas, los cambios morfológicos en el núcleo y el aumento de la actividad caspasa.

6. Conclusiones

Toxicidad ejercida por
contaminantes acuáticos sobre
microalgas de agua dulce



1. El crecimiento de los cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* se ve negativamente afectado por la adición del herbicida atrazina al medio de cultivo, de una forma dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.
2. La atrazina provoca una pérdida de pigmentos fotosintéticos y una reducción de la autofluorescencia en las células microalgales. Además, este herbicida provoca desajustes fotosintéticos en las células de *C. reinhardtii* basadas en alteraciones observadas en perfil transcriptómico, así como la desaparición de algunas proteínas relacionadas con la fotosíntesis.
3. La respuesta de las células microalgales a una concentración subletal de atrazina detectada por citometría de flujo se caracteriza por la inducción de un estrés oxidativo, reflejado por los niveles intracelulares incrementados del ión superóxido y peróxido de hidrógeno, una despolarización de la membrana plasmática, una hiperpolarización de la membrana mitocondrial, una reducción de la actividad esterasa inespecífica, un incremento del nivel de calcio libre citoplasmático y un aumento de la actividad caspasa.
4. La modificación de la expresión de genes relacionados con actividad antioxidante observada mediante RT-qPCR sugiere un sistema antioxidante versátil y flexible en respuesta a la sobreproducción de ROS.
5. Los análisis por RNA-Seq muestran una alteración energética en las células microalgales expuestas al herbicida. Los datos transcriptómicos revelan mayor abundancia de los transcritos relacionados con la generación de energía heterotrófica y disposición de electrones en las células estresadas, los cambios más significativos se observan en los genes implicados en el catabolismo de aminoácidos y en los procesos de respiración celular.
6. Los resultados obtenidos sugieren una inhibición de la fotosíntesis provocada por el mecanismo de acción del herbicida, debido a esto las células tienen que obtener energía a través del metabolismo heterotrófico, teniendo en cuenta estos resultados el incremento de contaminantes en los sistemas acuáticos puede conllevar a un descenso dramático en la fijación global de CO₂.
7. La atrazina provoca la activación de la cascada de caspasas, alteraciones en la morfología del núcleo y presencia autofagosomas en las células de *C. reinhardtii*, indicando fenómenos de senescencia celular en estos cultivos.

8. Las alteraciones moleculares y celulares obtenidas sugieren que la exposición a sustancias químicas, como la atrazina, induce una sobreproducción de ROS que produce alteraciones fisiológicas y bioquímicas en las células que finalmente conllevan a fenómenos de senescencia celular en las poblaciones microalgales, comprometiendo la biodiversidad, estructura y función de los niveles más altos de la cadena trófica en los ecosistemas de agua dulce.
9. Los resultados obtenidos han permitido caracterizar la respuesta de la microalga *C. reinhardtii* al herbicida atrazina a diferentes niveles de la fisiología y bioquímica celular, avalando la utilización de estos parámetros como biomarcadores en ensayos de toxicidad.

7. Conclusions

Toxicidad ejercida por
contaminantes acuáticos sobre
microalgas de agua dulce



1. The growth of *Chlamydomonas reinhardtii* cultures is negatively affected by the addition of the herbicide atrazine to the culture medium, in a concentration and time-exposure dependent manner.
2. Atrazine provokes a loss of photosynthetic pigments and a reduction of the autofluorescence in microalgal cells. Moreover, this herbicide causes photosynthetic imbalances in *C. reinhardtii* cells based on alterations observed in the transcriptomic profile, as well as the disappearance of some proteins related to photosynthesis.
3. The response of microalgae cells to a sublethal concentration of atrazine detected with flow cytometry is characterized by the induction of oxidative stress, reflected by the increased intracellular levels of superoxide ion and hydrogen peroxide, a plasma membrane depolarization, a hyperpolarization of the mitochondrial membrane, a reduction of non-specific esterase activity, an increase in the level of free cytoplasmic calcium and an increase in caspase activity.
4. The observed modification of the expression of antioxidant related-genes suggests a versatile and flexible antioxidant system in response to ROS overproduction.
5. RNA-Seq analysis indicates energy alteration in microalgal cells exposed to the herbicide. Transcriptomic data revealed higher abundances of transcripts related to heterotrophic energy generation and electron disposal in the stressed cells, the most significant changes were observed in genes implicated in amino acid catabolism and respiratory cellular processes.
6. Obtained results suggest an inhibition of the photosynthesis provoked by the mechanism of action of the herbicide, due to this, cells have to get energy through a heterotrophic metabolism. Taking into account these results, the increase in some pollutants in aquatic systems could lead to a dramatic decrease in CO₂ fixation at a global level.
7. Atrazine provokes the activation of caspase cascade, as well as nuclear morphological alterations and autophagosomes in *C. reinhardtii* cells, indicating cellular senescence in these cultures
8. Reported molecular and cellular alterations suggest that exposure to chemical substances, such as atrazine, induces ROS that produces physiological and biochemical alterations in cells that finally lead to the occurrence of cellular

senescence alterations in the microalgal populations, potentially compromising biodiversity, structure and function of higher trophic levels in freshwater ecosystems.

9. Obtained results have allowed to characterizing the response of the microalga *C. reinhardtii* to the herbicide atrazine at different levels of cell physiology and biochemistry, endorsing the use of these parameters as biomarkers in toxicity tests.

8. Bibliografía

Toxicidad ejercida por
contaminantes acuáticos sobre
microalgas de agua dulce



- Abalde, J., Cid, A., Reiriz, S., Torres, E., Herrero, C., 1995. Response of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to copper toxicity in short time experiments. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 54, 317-324.
- Abalde, J., Fábregas, J., Herrero, C., 1991. β -carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources. Bioresour. Technol. 38, 121-125.
- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A., Ibraheem, I.B.M., 2012. Microalgae and wastewater treatment. Saudi J. Biol. Sci. 19, 257-275.
- Adler, N.E., Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., 2007. Flow cytometry as a tool to study phytotoxic modes of action. Environ. Toxicol. Chem. 26, 297e306.
- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol. 105, 121-126.
- Affenzeller, M.J., Dareshouri, A., Andosch, A., Lutz, C., Lutz-Meindl, U., 2009. Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. J. Exp. Bot. 60, 939-954.
- Agustí, S., Satta, M. P., Mura, M. P., Benavent, E., 1998. Dissolved esterase activity as a tracer of phytoplankton lysis: evidence of high phytoplankton lysis rates in the northwestern Mediterranean. Limnol. Oceanogr. 43, 1836-1849.
- Ahii, M., Teresa, A., Grac, M., Parrish, C.C., 2015. Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). Aquat. Toxicol. 160, 87-95.
- Aksmann, A., Pokora, W., Baścik-Remisiewicz, A., Dettlaff-Pokora, A., Wielgomas, B., Dziadziuszko, M., Tukaj, Z., 2014. Time-dependent changes in antioxidative enzyme expression and photosynthetic activity of *Chlamydomonas reinhardtii* cells under acute exposure to cadmium and anthracene. Ecotoxicol. Environ. Saf. 110, 31-40.
- Aktar, M.W., Sengupta, D., Chowdhury, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. Interdiscip. Toxicol. 2, 11-12.
- Al-Wabel, M.I., Abdel-Nasser, G., Al-Turki, A.M., El-Saeid, M.H., 2010. Behavior of atrazine and malathion pesticides in soil: sorption and degradation processes. J. Appl. Sci. 10, 1740-1747.
- Allen, M.D., Kropat, J., Tottey, S., Del Campo, J.A., Merchant, S.S., 2007. Manganese deficiency in *Chlamydomonas* results in loss of photosystem II and MnSOD function,

sensitivity to peroxides, and secondary phosphorus and iron deficiency. *Plant Physiol.* 143, 263-277.

Andreev, I.M., 2001. Functions of the vacuole in higher plants cells. *Russ. J. Plant. Physiol.* 48, 672-680.

Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant, Biol.* 55, 373-399.

Arsenault, G., Cvetkovic, A.D., Popovic, R., 1993. Toxic effects of copper on *Selenastrum capricornutum* measured by a flow cytometry-based method. *Water Pollut. Res. J. Can.* 28, 757-763.

Asada, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141, 391-396.

Assaf, N.A., Turco, R.F., 1994. Influence of carbon and nitrogen application on the mineralization of atrazine and its metabolites in soil. *J. Pest. Sci.* 41, 41-47.

Baba, M., Suzuki, I., Shiraiwa, Y. 2011. Proteomic analysis of high-CO₂-inducible extracellular proteins in the unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell. Physiol.* 52, 1302-1314.

Bai, X., Sun, C., Xie, J., Song, H., Zhu, Q., Su, Y., Qian, H., Fu, Z., 2015. Effects of atrazine on photosynthesis and defense response and the underlying mechanisms in *Phaeodactylum tricornutum*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 17499-17507.

Battah, M., Shabana, E.F., Kobbia, I.A., Eladel, H.M., 2001. Differential effects of thiobencarb toxicity on growth and photosynthesis of *Anabaena variabilis* with changes in phosphate level. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 235-239.

Baudet, S.L., Hollingworth, S., 1994. How to make and use calcium-specific mini-and microelectrodes. *Methods Cell Biol.* 40, 93-113.

Bauer, C.S., Plieth, C., Bethmann, B., Popescu, O., Hansen, U.P., Simonis, W., Schönknecht, G., 1998. Strontium-induced repetitive calcium spikes in a unicellular green alga. *Plant Physiol.* 117, 545-557.

Baugros J.B., Giroud B., Dessalces G., Grenier-Loustalot M.F., Cren-Olive C., 2008. Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples. *Anal. Chim. Acta* 607, 191-203.

- Bayne, B.L., Hawkins, A.J.S., Navarro, E., 1987. Feeding and digestion by the mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia: Mollusca) in mixtures of silt and algal cells at low concentrations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 111, 1-22.
- Becker, E.W., 1988. Micro-algae for human and animal consumption, in: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (Eds.), *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 222-256.
- Beckman, K.B., Ames, B.N., 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78, 547-581.
- Benemann, J.R., Weissman, J.C., 1984. Chemicals from microalgae, in: Wise, D.L. (Ed.), *Bioconversion Systems*. CRC Press, Boca Raton, Florida., pp. 59-70.
- Benov, L., Szejnberg, L., Fridovich, I., 1998. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 826-831.
- Bérard, A., Dorigo, U., Mercier, I., Becker-van Slooten, K., Grandjean, D., Leboulanger, C., 2003. Comparison of the ecotoxicological impact of triazines Irgarol 1051 and atrazine on microalgal cultures and natural microalgal communities in Lake Geneva. *Chemosphere* 53, 935-944.
- Besplug. J., Filkowski, J., Burke, P., Kovalchuk, I., Kovalchuk, O., 2004. Atrazine induces homologous recombination but not pointmutation in the transgenic plant-based biomonitoring assay. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 296-300.
- Bi Fai, P., Grant, A., Reid, B., 2007. Chlorophyll *a* fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1520-1531.
- Bi, Y.F., Miao, S.S., Lu, Y.C., Qiu, C.B., Zhou, Y., Yang, H., 2012. Phytotoxicity, bioaccumulation and degradation of isoproturon in green algae. *J. Hazard. Mater.* 243, 242-249.
- Bidle, K.D., 2016. Programmed cell death in unicellular phytoplankton. *Curr. Biol.* 26, R594-R607.
- Biemann, K., Gapp, G., Seibl, J., 1959. Applications of Mass Spectrometry to Structure Proteins. I. Amino Acids Sequence and Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 2274-2275.
- Bienvenut, W.V., Espagne, C., Martinez, A., Majeran, W., Valot, B., Zivy, M., Vallon, O., Adam, Z., Meinel, T., Giglione, C., 2011. Dynamics of post-translational modifications and protein stability in the stroma of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Proteomics*, 11, 1734-1750.

- Bishoff, H., 1959. Some observations on *Chlamydomonas microhalophila* sp. nov. Biol. Bull. 117, 54-62.
- Blaise, C., Ménard, L., 1998. A micro-algal solid phase test to assess the toxic potential of freshwater sediments. Water Qual. Res. J. Can. 33, 133-151.
- Bochenek, M., Etherington, G. J., Koprivova, A., Mugford, S. T., Bell, T. G., Malin, G. Kopriva, S. 2013. Transcriptome analysis of the sulfate deficiency response in the marine micro-alga *Emiliana huxleyi*. New Phytol. 199, 650-62.
- Bold, H., Wynne, M., 1985. Introduction to the Algae. Prentice-Hall, New Jersey. pp 720.
- Bonneau, L., Ge, Y., Drury, G.E., Gallois, P., 2008. What happened to plant caspases? J. Exp. Bot. 59, 491-499.
- Booij, P., Sjollem, S.B., van der Geest, H.G., Leonards, P.E.G., Lamoree, M.H., de Voogt, W.P., Admiraal, W., Laane, R.W.P.M. Vethaak, A.D., 2015. Toxic pressure of herbicides on microalgae in Dutch estuarine and coastal waters. J. Sea Res. 102, 48-56.
- Borowitzka, M.A., 1988. Vitamins and fine chemicals from micro-algae, in: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (Eds.), Micro-algal Biotechnology. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 153-196.
- Borowitzka, M.A., 1992. Algal biotechnology products and processes-matching science and economics. J. Appl. Phycol. 4, 267-279.
- Borowitzka, M.A., 1995. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. J. Appl. Phycol. 7, 3-15.
- Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J., 1988. Microalgal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge. 477 pp.
- Bortner, C.D., Gómez-Angelats, M., Cidlowski, J.A., 2001. Plasma membrane depolarization without repolarization is an early molecular event in anti-fas-induced apoptosis. J. Biol. Chem. 276, 4303-4314.
- Bouix, M., Ghorbal, S., 2015. Rapid assessment of *Oenococcus oeni* activity by measuring intracellular pH and membrane potential by flow cytometry, and its application to the more effective control of malolactic fermentation. Int. J. Food Microbiol. 193, 139-146.
- Bradford, J.R., Hey, Y., Yates, T., Li, Y., Pepper, S.D., Miller, C.J., 2010. A comparison of massively parallel nucleotide sequencing with oligonucleotide microarrays for global

- transcription profiling. *BMC Genomics* 11, 282.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brain, R.A., Arnie, J.R., Porch, J.R., Hosmery, A.J., 2012. Recovery of photosynthesis and growth rate in green, blue-green, and diatom algae after exposure to atrazine. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 2572-2581.
- Breeuwer, P., Abee, T., 2000. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 193- 200.
- Brookes, J.D., Geary, S.D., Ganf, G.G., Burch, M.D., 2000. Use of FDA and flow cytometry to assess metabolic activity as an indicator of nutrient status in phytoplankton. *Mar. Freshwater Res.* 51, 817-823.
- Brown, R.M., Larson, D., Bold, H., 1964. Airborne algae: their abundance and heterogeneity. *Science* 143, 583-585.
- Burrows, E.M., 1971. Assessment of Pollution Effects by the use of Algae. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biol. Sci.* 177, 295-306.
- Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, M.P., Saoncella, A., 2001. An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Wat. Res.* 35, 69-76.
- Campisi, J., 2007. Aging and cancer cell biology. *Aging Cell* 6, 261-263.
- Carpenter, K.E., 1924. A study of the fauna of rivers polluted by lead mining in the aberystwyth district of cardiganshire. *Ann. Appl. Biol.* 11, 1-23.
- Carter, N.P., Meyer, E.W., 1990. Introduction to the principles of flow cytometry. In: Ormerod MG, editor. *Flow Cytometry. A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press. pp 1-28.
- Cebollero, E., González, R., 2007. Autophagy: from basic research to its application in food biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 25, 396-409.
- Cerejeira, M.J., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valerio, M.J., Silva, A., Ferreira, M., Silva-Fernandes, A.M., 2003. Pesticides in Portuguese surface and groundwaters. *Water Res.* 37, 1055-1063.
- Chalifour, A., Juneau, P., 2011. Temperature-dependent sensitivity of growth and photosynthesis of *Scenedesmus obliquus*, *Navicula pelliculosa* and two strains of

Microcystis aeruginosa to the herbicide atrazine. *Aquat. Toxicol.* 103, 9-17.

Chalifour, A., Spear, P.A., Boily, M.H., DeBlois, C., Giroux, I., Dassylva, N., Juneau, P., 2009. Assessment of toxic effects of pesticide extracts on different green algal species by using chlorophyll a fluorescence *Toxicol. Environ. Chem.* 91, 1315-1329.

Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 527-605.

Chankova, S.G., Dimova, E.G., Mitrovska, Z., Miteva, D., Mokerova, D.V., Yonova, P.A., Yurina, N.P., 2014. Antioxidant and HSP70B responses in *Chlamydomonas reinhardtii* genotypes with different resistance to oxidative stress. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 101, 131-137.

Cheloni, G., Marti, E., Slaveykova, V.I., 2016. Interactive effects of copper oxide nanoparticles and light to Green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 170, 120-128.

Chen, G., Wang, C., Shi, T., 2011. Overview of available methods for diverse RNA-Seq data analyses. *Sci. China Life Sci.* 54, 1121-1128.

Chen, H., Zhang, Y., He, C., Wang, Q., 2014. Ca²⁺ signal transduction related to neutral lipid synthesis in an oil-producing green alga *Chlorella* sp. C2. *Plant Cell Physiol.* 55, 634-644.

Chen, J., Huo, J., Jia, Z., Song, Y., Li, Y., Zhang, L., 2015. Effects of atrazine on the proliferation and cytotoxicity of murine lymphocytes with the use of carboxyfluorescein succinimidyl ester-based flow cytometric approaches. *Food Chem. Toxicol.* 76, 61-69.

Chen, Z., Gong, Y., Fang, X., Hu, H., 2012. *Scenedesmus* sp. NJ-1 isolated from Antarctica: a suitable renewable lipid source for biodiesel production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 3219-3225.

Chisholm, S.W., Olson, R.J., Zettler, E.R., Goericke, R., Waterbury, J.B., Welschmeyer, N.A., 1988. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature* 334, 340-343.

Choi, C.J., Berges, J.A., Young, E.B., 2012. Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll a fluorescence: variable responses among freshwater microalgae. *Water Res.* 46, 2615-2626.

Chomczynski, P., Sacchi, N., 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat.*

Protoc. 1, 581-585.

- Chou, T.C., Martin, N., 2005. CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantification of Synergism and Antagonism in Drug Combinations and the Determination of IC₅₀ and ED₅₀ and LD₅₀ Values. ComboSyn, Inc., Paramus, NJ.
- Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C., Abalde, J. 1995b. Flow cytometry determination of acute physiological changes in a marine diatom stressed by copper. *Microbiología SEM* 11, 455-460.
- Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C., Abalde, J., 1996a. Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry. *Cytometry* 25, 32-36.
- Cid, A., Herrero, C., Abalde, J., 1996b. Functional analysis of phytoplankton by flow cytometry: a study of the effect of copper on a marine diatom. *Sci. Mar.* 60, 303-308.
- Cid, A., Herrero, C., Torres, E., Abalde, J., 1995a. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*: Effects on photosynthesis and related parameters. *Aquat. Toxicol.* 31, 165-174.
- Cid, A., Torres, E., Herrero, C., Abalde, J., 1997. Disorders provoked by copper in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* in short-time exposure assays. *Cah. Biol. Mar.* 38, 201-206.
- Cid, C., Garcia-Descalzo, L., Casado-Lafuente, V., Amils, R., Aguilera, A., 2010. Proteome analysis of the response of an acidophilic strain of *Chlamydomonas sp. (Chlorophyta)* to natural metal-rich water. *Proteomics* 10, 2026-2036.
- Cirulis, J.T., Scott, J.A., Ross, G.M., 2013. Management of oxidative stress by microalgae. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 91, 15-21.
- Cole, D.J., 1994. Detoxification and activation of agrochemicals in plants. *Pest. Sci.* 42, 209-222.
- Contento, A.L., Xiong, Y., Bassham, D.C., 2005. Visualization of autophagy in *Arabidopsis* using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. *Plant. J.* 42, 598-608.
- Corrêa, A.X.R., Tamanaha, M.S., Horita, C.O., Radetski, M.R., Corrêa, R., Radetski, C.M., 2009. Natural impacted freshwaters: in situ use of alginate immobilized algae to the assessment of algal response. *Ecotoxicol.* 18, 464-469.

- Cossarizza, A., Salvioli, S., 2001. Analysis of mitochondria during cell death. En: Cytometry. Part A. Darzynkiewicz, Z., Crissman, H.A., Robinson, J.P. (Ed.). Academic Press, London. pp. 467-486.
- Costantini, P., Petronilli, V., Colonna, R., Bernardi, P., 1995. On the effects of paraquat on isolated mitochondria. Evidence that paraquat causes opening of the cyclosporine A-sensitive permeability transition pore synergistically with nitric oxide. *Toxicology* 99, 77-88.
- Couderchet, M., Vernet, G., 2003. Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 271-277.
- Cremlyn, R.J., 1991. *Agrochemicals: Preparation and Mode of Action*. John Wiley & Sons, Inc., New York. 396 pp.
- Crespo, J.L., Diaz-Troya, S., Florencio, F.J., 2005. Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 139,1736-1749.
- Crompton, T.R., 1997. *Toxicants in the Aqueous Ecosystem*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England. 382 pp.
- Cuaresma, M., Casal, C., Forjan, E., Vilchez, C., 2011. Productivity and selective accumulation of carotenoids of the novel extremophile microalga *Chlamydomonas acidophila* grown with different carbon sources in batch systems. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 167-177.
- Cunningham, A., 1993. Analysis of microalgae and cyanobacteria by flowcytometry. In: Lloyd, D. (Ed.), *Flow Cytometry in Microbiology*. Springer-Verlag, London, UK, pp. 131-142.
- Damerval, C., DeVienne, D., Zivy, M., Thiellement, H., 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins. *Electrophoresis* 7, 52-54.
- Darehshouri, A., Affenzeller, M., Lütz-Meindl, U., 2008. Cell death upon H₂O₂ induction in the unicellular green alga *Micrasterias*. *Plant Biol.* 10, 732-745.
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P., Traganos, F., 1992. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13, 795-808.
- Davies, E., Stankovic, B., Azama, K., Shibata, K., Abe, S., 2001. Novel components of the plant cytoskeleton: A beginning to plant "cytomics." *Plant Sci.* 160, 185-196.

- De Gara, L., Tommasi, F., 1999. Ascorbate redox enzymes: a network of reactions involved in plant development. *Rec. Res. Develop. Phytochem.* 3, 1-15.
- de Montaigu, A., Sanz-Luque, E., Galván, A., Fernández, E., 2010. A soluble guanylate cyclase mediates negative signaling by ammonium on expression of nitrate reductase in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 22, 1532-1548.
- De Pauw, N., Persoone, G., 1988. Microalgae for aquaculture, in: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (Eds.), *Microalgal Biotechnology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 197-221.
- Debelius, B., Forja, J.M., Del Vals, A., Lubián, L.M., 2008. Effect of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and atrazine on marine microalgae. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 559-568.
- Debenest, T., Petit, A.N., Gagné, F., Kohli, M., Nguyen, N., Blaise, C., 2011. Comparative toxicity of a brominated flame retardant (tetrabromobisphenol A) on microalgae with single and multi-species bioassays. *Chemosphere* 85, 50-55.
- Deere, D., Porter, J., Edwards, C., Pickup, R., 1995. Evaluation of the suitability of bis-(1,3-dibarbituric acid) trimethine oxonol (DiBAC₄(3)) for the flow cytometric assessment of bacterial viability. *FEMS Microbiol. Lett.* 130, 165-170.
- del Río, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M., Barroso, J.B., 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol.* 141, 330-335.
- DeLorenzo, M.E., Leatherbury, M., Weiner, J.A., Lewitus, A.J., Fulton, M.H., 2004. Physiological factors contributing to the species-specific sensitivity of four estuarine microalgal species exposed to the herbicide atrazine. *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* 7, 137-146.
- Deneer, J.W., 2000. Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. *Pest. Manag. Sci.* 56, 516-520.
- Dewez, D., Geoffroy, L., Vernet, G., Popovic, R., 2005. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquat. Toxicol.* 74, 150-159.
- Di Girolamo, F., Lante, I., Muraca, M., Putignani, L., 2013. The Role of Mass Spectrometry in the "Omics" Era. *Curr. Org. Chem.* 17, 2891-2905.
- Didur, O., Perreault, F., Oukarroum, A., Dewez, D., Popovic, R., 2012. Alteration of photosystem II activity by atrazine on *Chlamydomonas reinhardtii* synchronized and asynchronized cell cycle cultures. *Toxicol. Environ. Chem.* 94, 906-917.

- Diner, B.A., Petrouleas, V., 1987. Light-induced oxidation of the acceptor-side Fe(II) of photosystem II by exogenous quinones acting through the QB binding site: II. Blockage by inhibitors and their effects on the Fe(III) EPR spectra. *Biochim. Biophys. Acta* 893, 138-48.
- Diniz, C.M., Pacheco, A.C.L., Farias, K.M., de Oliveira, D.M., 2012. The Eukaryotic Flagellum Makes the Day: Novel and Unforeseen Roles Uncovered After Post-Genomics and Proteomics Data. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 524-546.
- Directive 1107/2009 of the European Parliament and of the Council, of 21 October 2009, concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. *OJ L* 309, 24.11.2009.
- Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, of 23 October 2000, establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Off. J. Eur. Commun.* L327, 22.12.2000, pp. 01-72.
- Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council, of 12 August 2013, amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Off. J. Eur. Union* L226, 24.8.2013, pp. 01-17.
- Dixon, D.P., Cummins, L., Cole, D.J., Edwards, R., 1998. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 258-266.
- Dixon, D.P., Skipsey, M., Edwards, R., 2010. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 71, 338-350.
- 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, 622-628.
- Dowling, V.A., Sheehan, D., 2006. Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology. *Proteomics* 6, 5597-5604.
- Dubelaar, G.B.J., Jonker, R.R., 2000. Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton. *Sci. Mar.* 64,135-156.
- Durand, P.M., Rashidi, A., Michod, R.E., 2011. How an organism dies affects the fitness of its neighbors. *Am. Nat.* 177, 224-232.
- EC SANCO/10495/2003-final, 2003. Review Report for the Active Substance Simazine.
- EC SANCO/10496/2003-final, 2003. Review Report for the Active Substance Atrazine.

- EC WFD, 2000. Water Framework Directive 2000/60/EC. European Commission.
- EC WSFD, 2008. Marine Environmental Policy (Marine Strategy Framework Directive 2008/56/EC), 2008. Eur. Commission.
- EC, 2006. Regulation (EC) N° 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) N° 793/93 and Commission Regulation (EC) N° 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC and 2000/21/EC. OJ L396/1, 30 December 2006.
- EEC, 1991. Directive 91/414/EEC. Council Directive of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. OJ L 230.
- Ekelund, N.G.A., Aronson, K.A., 2007. Changes in chlorophyll a fluorescence in *Euglena gracilis* and *Chlamydomonas reinhardtii* after exposure to wood-ash. Environ. Exp. Bot. 59, 92-98.
- El-Sheekh, M., Abomohra Ael, F., Hanelt, D., 2013. Optimization of biomass and fatty acid productivity of *Scenedesmus obliquus* as a promising microalga for biodiesel production. World J. Microbiol. Biotechnol. 29, 915-922.
- Elbaz, A., Wei, Y.Y., Meng, Q., Zheng, Q., Yang, Z.M., 2010. Mercury-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in *Chlamydomonas reinhardtii*. Ecotoxicology 19, 1285-1293.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol. Pathol. 35, 495-516.
- Endo, R., Omasa, K., 2004. Chlorophyll fluorescence imaging of individual algal cells: effects of herbicide on *Spirogyra distenta* at different growth stages. Environ. Sci. Technol. 38, 4165-4168.
- Epp, O., Ladenstein, R., Wendel, A., 1983. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. Eur. J. Biochem. 133, 51-69.
- Epstein, E., Bloom, A.J., 2005. Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. Sinauer Associates Inc., Massachusetts. pp. 380.
- Esperanza, M., Cid, Á., Herrero, C., Rioboo, C., 2015. Acute effects of a prooxidant herbicide on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: Screening cytotoxicity and genotoxicity endpoints. Aquat. Toxicol. 165, 210–221.

- Eullaffroy, P., Vernet, G., 2003. The F684/F735 chlorophyll fluorescence ratio: a potential tool for rapid detection and determination of herbicide phytotoxicity in algae. *Wat. Res.* 37, 1983-1990.
- Fábregas, J., Herrero, C., 1990. Vitamin content of four marine microalgae. Potencial use as source of vitamins in nutrition. *J. Ind. Microbiol.* 5, 259-264.
- Fábregas, J., Herrero, C., Angulo, L., Cabezas, B., 1986. Antibacterial activity of the marine diatom) *Avicula laevissima* mediated by extracellular products. *IRCS Med. Sci.* 14, 493-494.
- FAOStat. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2014). Available online: faostat.fao.org (accessed on 18 August 2017).
- Fentem, J., Balls, M. 1993. Replacement of fish in ecotoxicology testing: use of bacteria, other lower organism and fish cells *in vitro*. In: *Ecotoxicology Monitoring*. Richardson, M. (Ed.). VCH, Weinheim. pp. 71-81.
- Fernández-Naveira, A., Rioboo, C., Cid, A., Herrero, C., 2016. Atrazine induced changes in elemental and biochemical composition and nitrate reductase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Phycol.* 262, 1-8.
- Fernández-Puente, P., Máteos, J., Fernández-Costa, C., Oreiro, N., Fernández-López, C., Ruiz-Romero, C., Blanco, F.J., 2011. Identification of a panel of novel serum osteoarthritis biomarkers. *J. Proteomics Res.* 10, 5095-5101.
- Ferradás, Y., López, M., Rey, M., González, M.V., 2014. Programmed cell death in kiwifruit stigmatic arms and its relationship to the effective pollination period and the progamic phase. *Ann. Bot.* 114, 35-45.
- Fischer, B.B., Rüfenacht, K., Dannenhauer, K., Wiesendanger, M., Eggen, R.I.L., 2010. Multiple stressor effects of high light irradiance and photosynthetic herbicides on growth and survival of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2211-2219.
- Florita, F., Catherine, J.C., Philip, M., Andrew, P.N., 2013. Phytotoxicity of four photosystem II herbicides to tropical seagrasses. *PLoS One* 8, e75798.
- Flynn, K., Spellman, T., 2009. Environmental levels of atrazine decrease spatial aggregation in the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1228-1233.
- Fogg, G.E., Thake, B., 1987. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. The University of

Wisconsin press, Madison, WI 269 pp.

- Forbes, V.E., Forbes, T.L., 1994. Ecotoxicology in theory and practice. In: Depledge, M.H., Sanders, B. (Eds.), Ecotoxicology Series 2. Chapman & Hall, London, UK, pp. 247.
- Forbes, V.E., Forbes, T.L., 1994. Ecotoxicology in theory and practice. In: Depledge, M.H., Sanders, B. (Eds.), Ecotoxicology Series 2. Chapman & Hall, London, UK. pp. 247.
- Förster, B., Mathesius, U., Pogson, B.J., 2006. Comparative proteomics of high light stress in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proteomics* 6, 4309-4320.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17, 1866-1875.
- Franklin, D.J., Berges, J.A., 2004. Mortality in cultures of the dinoflagellate *Amphidinium carterae* during culture senescence and darkness. *Proc. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* B 271, 2099-2107.
- Franklin, D.J., Brussaard, C.P.D., Berges, J.A., 2006. What is the role and nature of programmed cell death in phytoplankton ecology? *Eur. J. Phycol.* 41, 1-14.
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Lim, P., 2001. Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 160-170.
- Franqueira, D., Orosa, M., Torres, E., Herrero, C., Cid, A., 2000. Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. *Sci. Total Environ.* 247, 119-126.
- Fredriksson, A., Nyström, T., 2006. Conditional and replicative senescence in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 612-618.
- Fridovich, I., 1978. Oxygen free radicals and tissue damage: chairman's introduction. *Ciba. Found. Symp.* 65, 1-4.
- Fu, F., Wang, Q., 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *J. Environ. Manage.* 92, 407-418.
- Galbraith, D.W., Harpins, K.R., Jefferson, R.A., 1988. Flow cytometric characterization of the chlorophyll contents and size distributions of plant protoplasts. *Cytometry* 9, 75-83.
- Galloway, T.S., Sanger, R.C., Smith, K. L., Fillmann, G., Readman, J.W., 2002. Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays.

- Environ. Sci. Technol. 36, 2219-2226.
- Gao, Y.P., Fang, J.G., Zhang, J.H., Ren, L.H., Mao, Y.Z., Li, B., Zhang, M.L., Liu, D.H., Du, M.R., 2011. The impact of the herbicide atrazine on growth and photosynthesis of seagrass, *Zostera marina* (L.), seedlings. Mar Pollut. Bull. 62, 1628-1631.
- Garg, N., Manchanda, G., 2009. ROS generation in plants: boon or bane? Plant Biosyst. 143, 81-96.
- Gaynor, J.D., MacTavish, D.C., Labaj, A.B., 1998. Atrazine and metolachlor residues in brookston CL following conventional and conservation tillage culture. Chemosphere 36, 3199-3210.
- Gayoso, C.M., Mateos, J., Méndez, J.A., Fernández-Puente, P., Rumbo, C., Tomás, M., Martínez de Ilarduya, O., Bou, G., 2014. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. J. Proteome Res. 13, 276-460.
- Geary, S., Ganf, G., Brookes, J., 1997. The use of FDA and flow cytometry to measure the metabolic activity of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. Verh. Int. Verein Limnol. 26, 2367-2369.
- Geoffroy, L., Dewez, D., Vernet, G., Popovic, R., 2003. Oxyfluorfen toxic effect on *S. obliquus* evaluated by different photosynthetic and enzymatic biomarkers. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45, 445- 452.
- Geoffroy, L., Gilbin, R., Simon, O., Floriani, M., Adam, C., Pradines, C., Cournac, L., Garnier-Laplace, J., 2007. Effect of selenate on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. Aquat Toxicol. 83, 149-158.
- Giardi, M.T., Masojídek, J., Godde, D., 1997. Effects of abiotic stresses on the turnover of the D1 reaction centre II protein. Physiol. Plant. 101, 635-642.
- Gilbert, F., Galgani, F., Cadiou, Y., 1992. Rapid assessment of metabolic activity in marine microalgae: application in ecotoxicological tests and evaluation of water quality. Mar. Biol. 112, 199-205.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 48, 909-930.
- Ginebreda, A., Kuzmanovic, M., Guasch, H., de Alda, M.L., López-Doval, J.C., Muñoz, I., Barceló, D., 2014. Assessment of multi-chemical pollution in aquatic ecosystems using

- toxic units: Compound prioritization, mixture characterization and relationships with biological descriptors. *Sci. Total Environ.* 468-469, 715-723.
- Giraud, M., Cottin, G., Esperanza, M., Gagnon, P., De Silva, A., Houde, M., 2017. Transcriptional and cellular effects of benzotriazole UV-stabilizers UV-234 and UV-328 in the freshwater invertebrates, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 9999, 1-10.
- Giri, B.R., Roy, B., Sinha-Babu, S.P., 2013. Evidence of apoptosis in *Raillietina echinobothrida* induced by methanolic extracts of three traditional medicinal plants of Northeast India. *Exp. Parasitol.* 134, 466-473.
- Girling, A.E., Pascoe, D., Janssen, C.R., Peither, A., Wenzel, A., Schäfer, H., Neumeier, B., Mitchell, G.C., Taylor, E.J., Maund, S.J., Lay, J.P., Jüttner, I., Crossland, N.O., Stephenson, R.R., Persoone, G., 2000. Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 148-176.
- Girs, T.G., Shirmohammadi, A., Wienhold, B.J., 1994. Field-scale mobility and persistence of commercial and starch-encapsulated atrazine and alachlor. *J. Environ. Qual.* 23, 355-359.
- Gómez, L.M., 2007. Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Rev. Cub. Quim.* 9, 3-20.
- Gong, M., van der Luit, A., Knight, M.R., Trewavas, A.J., 1998. Heat-shock-induced changes in intracellular Ca^{+2} level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. *Plant Physiol.* 116, 429-437.
- González-Ballester, D., Casero, D., Cokus, S., Pellegrini, M., Merchant, S.S., Grossman, A.R., 2010. RNA-seq analysis of sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells reveals aspects of acclimation critical for cell survival. *Plant Cell.* 22, 2058-2084.
- González-Barreiro, O., Rioboo, C., Cid, A., Herrero, C., 2004. Atrazine-induced chlorosis in *Synechococcus elongatus* cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 301-307.
- González-Barreiro, O., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2006. Removal of triazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms. *Environ. Pollut.* 144, 266-271.
- González-López, C.V., Acién, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., Molina, E., 2011. Uso de microalgas como alternativa a las tecnologías disponibles de mitigación de emisiones

- antropogénicas de CO₂. Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal 2, 93-106.
- 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. 186, 50-66.
- Gorman, D.S., Levine, R.P., 1966. Cytochrome f and plastocyanin: Their sequence in the photoelectric transport chain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 1665-1669.
- Goulding, K.H., 1985. The effects of pesticides on algae. Rev. Environ. Health 5, 199-253.
- Graymore, M., Stagnitti, F., Allinson, G., 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. Environ. Int. 26, 483-495.
- Graziano, L.M., Geider, R.J., Li, W.K.W., Olaizola, M., 1996. Nitrogen limitation of North Atlantic phytoplankton: analysis of physiological condition in nutrient enrichment experiments. Aquat. Microb. Ecol. 11, 53-64.
- Gregorio, V., Chèvre, N., 2014. Assessing the risks posed by mixtures of chemicals in freshwater environments: case study of Lake Geneva, Switzerland. Wiley Interdisciplinary Rev.: Water 1, 229-247
- Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. 260, 3440-3450.
- Guanzon, N.G., Nakahara, H., 2002. Growth and photosynthesis inhibition by agricultural pesticides in three freshwater microalgae. Fisheries Sci. 68, 144-151.
- Gumprecht, R., Gerlach, H., Nehrkorn, A., 1995. FDA hydrolysis and resazurin reduction as a measure of microbial activity in sediments from the south-east Atlantic. Helgol. Mar. Res. 49, 189-199.
- Hadjoudja, S., Vignoles, C., Delucht, V., Lenain, J.F., Le Jeune, A.H., Baudu, M., 2009. Short term copper toxicity on *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris* using flow cytometry. Aquat. Toxicol. 94, 255-264.
- Haglund, K., 1997. The use of algae in aquatic toxicity assessment. In: Round F.E. y Chapman D.J. (Ed.). Progress in Phycological Research. Biopress Ltd., Bristol, England. pp. 181-212.
- Halling-Sørensen, B., 2000. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. Chemosphere 40, 731e739.

- Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., Ohsumi, Y., 2002. Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene. *Plant Physiol.* 129, 1181-1193.
- Harris, E.H. 1989. The *Chlamydomonas* Sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press Inc., San Diego. 780 pp.
- Harris, E.H., 2001. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 363-406.
- Harris, E.H., 2009. The *Chlamydomonas* Sourcebook. Academic Press, Oxford. pp 480.
- Hauser, B.A., Sun, K., Oppenheimer, D.G., Sage, T.L., 2006. Changes in mitochondrial membrane potential and accumulation of reactive oxygen species precede ultrastructural changes during ovule abortion. *Planta* 223, 492-499.
- Hayes, T.B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., Adame, L., Chan, E., Buchholz, D., Stueve, T., Gallipeau, S., 2010. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *PNAS* 107, 4612-4617.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: i. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189-198.
- Heitman, J., Movva, N.R., Hall, M.N., 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905-909.
- Hemschemeier, A., Casero, D., Liu, B., Benning, C., Pellegrini, M., Happe, T., Merchant, S.S., 2013. Copper response regulator1-dependent and -independent responses of the *Chlamydomonas reinhardtii* transcriptome to dark anoxia. *Plant Cell* 25, 3186-3211.
- Henderson, L.M., Chappell, J.B., 1993. Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur. J. Biochem.* 217, 973-980.
- Hilton, R., Trainor, F., 1963. Algae from a Connecticut soil. *Plant Soil* 19, 396-399.
- Hirschberg, J., McIntosh, L., 1983. Molecular basis of herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. *Science* 222, 1346-1349.
- Hirschi, K., 2001. Vacuolar H⁺/Ca²⁺ transport: who's directing the traffic? *Trends in Plant Sci.* 6, 100-104.
- Ho, S.H., Chen, C.Y., Lee, D.J., Chang, J.S., 2011. Perspectives on microalgal CO₂- emission

mitigation systems -A review. *Biotechnol. Adv.* 29, 189-198.

- Hoehn, P., Ariyurek, Y., Thygesen, H.H., Vreugdenhil, E., Vossen, R.H., de Menezes, R.X., Boer, J.M., van Ommen, G.J., den Dunnen, J.T., 2008. Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms. *Nucleic Acids Res.* 36, e141.
- Hoffmann, D., Iinuma, Y., Herrmann, H., 2007. Development of a method for fast analysis of phenolic molecular markers in biomass burning particles using high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1143, 168-175.
- Hogan, A.C., Stauber, J.L., Pablo, F., Adams, M.S., Lim, R.P., 2005. The development of marine toxicity identification evaluation (TIE) procedures using a unicellular alga *Nitzschia closterium*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 433-443.
- Holzappel-Pschorn, A., Obst, U., Haberer, K., 1987. Sensitive methods for the determination of microbial activities in water samples using fluorogenic substrates. *Fresenius J. Anal. Chem.* 327, 521-523.
- Hong, W.K., Kim, C.H., Rairakhwada, D., Kim, S., Hur, B.K., Kondo, A., Seo, J.W., 2012. Growth of the oleaginous microalga *Aurantiochytrium* sp. KRS101 on cellulosic biomass and the production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35, 129-133.
- Hong, W.K., Rairakhwada, D., Seo, P.S., Park, S.Y., Hur, B.K., Kim, C.H., Seo, J.W., 2011. Production of lipids containing high levels of docosahexaenoic acid by a newly isolated microalga, *Aurantiochytrium* sp. KRS101. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164, 1468-1480.
- Hong, Y., Hu, H.Y., Xie, X., Li, F.M., 2008. Responses of enzymatic antioxidant and non-enzymatic antioxidants in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to the allelochemical ethy-2-methyl acetoacetate (EMA) isolated from reed (*Phragmites communis*). *J. Plant Physiol.* 165, 1264-1273.
- Hook, S.E., Osborn, H.L., Gissi, F., Moncuquet, P., Twine, N.A., Wilkins, M.R., Adams, M.S., 2014. RNA-Seq analysis of the toxicant-induced transcriptome of the marine diatom, *Ceratoneis closterium*. *Mar. Genomics* 16, 45-53.
- Hoppe, R.W., Bavister, B.D., 1984. Evaluation of the fluorescein diacetate (FDA) vital dye viability test with hamster and bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 6, 323-335.

- Huber, W., 1993. Ecotoxicological relevance of atrazine in aquatic systems. *Environ. Toxicol.* 12, 1865-1881.
- Huc, L., Lemarié, A., Guéraud, F., Héliès-Toussaint, C., 2012. Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro* 26, 709-717.
- Humby, P.L., Snyder, E.C.R., Durnford, D.G., 2013. Conditional senescence in *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlorophyceae*). *J. Phycol.* 49, 389-400.
- Hunt, D.F., Buko, A.M., Ballard, J.M., Shabanowitz, J., Giordani, A.B., 1981. Sequence analysis of polypeptides by collision activated dissociation on a triple quadrupole mass spectrometer. *Biol. Mass Spectrom.* 8, 397-408.
- Hyka, P., Lickova, S., Pribyl, P., Melzoch, K., Kovar, K., 2013. Flow cytometry for the development of biotechnological process with microalgae. *Biotechnol. Adv.* 31, 2-16.
- Idoine, A.D., Boulouis, A., Rupprecht, J., Bock, R., 2014. The diurnal logic of the expression of the chloroplast genome in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One* 9, e108760.
- ISO 8692, 2012. Water Quality-Fresh Water Algal Growth Inhibition Test With Unicellular Green Algae. International Organization for Standardization, Suiza.
- Izutsu, K.T., Felton, S.P., 1972. Plasma calcium assay, with use of the jellyfish protein, aequorin, as a reagent. *Clin. Chem.* 18, 77-79.
- Jamers, A., Blust, R., De Coen, W., 2009. Omics in algae: paving the way for a systems biological understanding of algal stress phenomena? *Aquat. Toxicol.* 92, 114-121.
- Jamers, A., De Coen, W., 2010. Effect assessment of the herbicide paraquat on a green alga using differential gene expression and biochemical biomarkers. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 893-901.
- Janknegt, P.J., De Graaff, C.M., Van De Poll, W.H., Visser, R.J.W., Rijstenbil, J.W., Buma, A.G.J., 2009. Short-term antioxidative responses of 15 microalgae exposed to excessive irradiance including ultraviolet radiation. *Eur. J. Phycol.* 44, 525-539.
- Jansen, M.A., Depka, B., Trebst, A., Edelman, M., 1993. Engagement of specific sites in the plastoquinone niche regulates degradation of the D1 protein in photosystem II. *J. Biol. Chem.* 268, 21246-21252.
- Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F., 1975. New spectrophotometric equations for determining

chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 167, 191-194.

Jepras, R.I., Carter, J., Pearson, S.C., Paul, F.E., Wilkinson, M.J., 1995. Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2696-2701.

Jepras, R.I., Paul, F.E., Pearson, S.C., Wilkinson, M.J., 1997. Rapid assessment of antibiotic effects on *Escherichia coli* by bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol and flow cytometry *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2001-2005.

Ji, C., Cao, X., Liu, H., Qu, J., Yao, C., Zou, H., Xue, S., 2015. Investigating cellular responses during photohydrogen production by the marine microalga *Tetraselmis subcordiformis* by quantitative proteome analysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 177, 649-661.

Jiang, H.M., Yang, J.C., Zhang, J.F., 2007. Effects of external phosphorus on the cell ultrastructure and the chlorophyll content of maize under cadmium and zinc stress. *Environ. Microbiol.* 61, 2696-2701.

Jiang, Y., Zhu, Y., Hu, Z., Lei, A., Wang, J., 2016. Towards elucidation of the toxic mechanism of copper on the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology* 25, 1417-1425.

Jimenez, C., Capasso, J.M., Edelstein, C.L., Rivard, C.J., Lucia, S., Breusegem, S., Berl, T., Segovia, M., 2009. Different ways to die: cell death modes of the unicellular chlorophyte *Dunaliella viridis* exposed to various environmental stresses are mediated by the caspase-like activity DEVDase. *J. Exp. Bot.* 60, 815-828.

Jochem, F.J., 1999. Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with fluorescein diacetate. *Mar. Biol.* 135, 721-728.

Jochem, F.J., 2000. Probing the physiological state of phytoplankton at the single-cell level. *Sci. Mar.* 64, 183-195.

Johnson, C.H., Knight, M.R., Kondo, T., Masson, P., Sedbrook, J., Haley, A., Trewaras, A.J., 1995. Circadian oscillations and chloroplastic free calcium in plants. *Science* 269, 1863-1865.

Johnson, X., Alric, J., 2013. Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. *Eukaryotic Cell* 12, 776-793.

- Jones, R.J., Muller, J., Haynes, D., Schreiber, U., 2003. Effects of herbicides diuron and atrazine on corals of the Great Barrier Reef. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 251,153-167.
- Kabra, A.N., Ji, M.K., Choi, J., Kim, J.R., Govindwar, S.P., Jeon, B.H., 2014. Toxicity of atrazine and its bioaccumulation and biodegradation in a green microalga, *Chlamydomonas mexicana*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 12270–12278.
- Källqvist, T., Svenson, A., 2003. Assessment of ammonia toxicity in tests with the microalga, *Nephroselmis pyriformis*, Chlorophyta. *Water Res.* 37, 477-484.
- Kanematsu, S., Iriguchi, N., Ienaga, A., 2010. Characterization of CuZn-superoxide dis- mutase gene from the green alga *Spirogyra sp.* (*Streptophyta*) Evolutionary implications for the origin of the chloroplastic and cytosolic isoforms. *Bull. Minamikyushu Univ.* 40, 65-77.
- Karas, M., Hillenkamp, F., 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 60, 2299-2301.
- Kelle, L.C., Romijn, E.P., Zamora, I., Yates, J.R., Marshall, W.F., 2005. Proteomic analysis of isolated *Chlamydomonas* centrioles reveal orthologs of ciliary-disease genes. *Curr. Biol.* 15, 1090-1098.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- Klapperstück, T., Glanz, D., Klapperstück, M., Wohlrab, J., 2009. Methodological aspects of measuring absolute values of membrane potential in human cells by flow cytometry. *Cytometry* 75A, 593-608.
- Klut, M.E., Stockner, J., Bisalputra, T., 1989. Further use of fluorochromes in the cytochemical characterization of phytoplankton. *Histochem. J.* 21, 645-650.
- Knight, H., Trewavas, A.J., Knight, M.R., 1996. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell* 8, 489-503.
- Knight, H., Trewavas, A.J., Knight, M.R., 1997. Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.* 12, 1067-1078.
- Knörzer, O.C., Durner, J., Böger, P., 1996. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiol. Plant.* 97, 388-396.

- Kobbia, I.A., Battah, M.G., Shabana, E.F., Eladel, H.M., 2001. Chlorophyll *a* fluorescence and photosynthetic activity as tools for the evaluation of simazine toxicity to *Protosiphon botryoides* and *Anabaena variabilis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 101-105.
- Konrad, K.R., Hedrich, R., 2008. The use of voltage-sensitive dyes to monitor signal-induced changes in membrane potential-ABA triggered membrane depolarization in guard cells. *Plant J.* 55, 161-173.
- Koo, H.J., Piao, Y., Pak, Y.K., 2012. Endoplasmic reticulum stress impairs insulin signaling through mitochondrial damage in SH-SY5Y cells. *Neurosignals* 701, 265-280.
- Kotrikla, A., Gatidou, G., Lekkas, T.D., 1999. Toxic effects of atrazine, diethyl-atrazine, deisopropyl-atrazine and metolachlor on *Chlorella fuscavar-fusca*. *Global NEST J.* 1, 39-45.
- Krieger-Liszka, A., 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 56, 337-346.
- Krol, E., Dziubinska, H., Trebaez, K., 2003. Low-temperature induced transmembrane potential changes in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Plant Cell Physiol.* 44, 527-533.
- Kruk, J., Holländer-Czytko, H., Oettmeier, W., Trebst, A.J., 2005. Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Plant Physiol.* 162, 749-757.
- Kuin, H., Koerten, H., Ghijsen, W.E.J.M., Munnik, T., van den Ende, H., Musgrave, A., 2000. *Chlamydomonas* contains calcium stores that are mobilized when phospholipase C is activated. *Planta* 210, 286-294.
- Kuzmin, E.V., Karpova, O.V., Elthon, T.E., Newton, K.J., 2004. Mitochondrial respiratory deficiencies signal up-regulation of genes for heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 279, 20672–20677.
- Kvíderová, J., Henley, W., 2005. The effect of ampicillin plus streptomycin on growth and photosynthesis of two halotolerant chlorophyte algae. *J. Appl. Phycol.* 17, 301-307.
- Lage, O.M., Sansonetty, F., O'Connor, J.E., Parente, A.M. 2001. Flow cytometric analysis of chronic and acute toxicity of copper(II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Cytometry* 44, 226-235.
- Lai, H.T., Hou, J.H., Su, C.I., Chen, C.L., 2009. Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 329-334.

- Laloi, C., Apel, K., Danon, A., 2004. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 323-328.
- Lamberth, C., Jeanmart, S., Luksch, T., Plant, A., 2013. Current challenges and trends in the discovery of agrochemicals. *Science* 341, 742-746.
- Laws, E.A., Chalup, M.S., 1991. A microalgal growth model. *Limnol. Oceanogr.* 35, 597-608.
- Leboulanger, C., Rimet, F., de Lacotte, M.H., Bérard, A., 2001. Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae. *Environ. Int.* 26, 131-135.
- Ledford, H.K., Niyogi, K.K., 2005. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant Cell Environ.* 28, 1037-1045.
- Ledvina, V., Janečková, E., Matalová, E., Klepárník, K., 2017. Parallel single-cell analysis of active caspase-3/7 in apoptotic and non-apoptotic cells. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 269-274.
- Lee, Y.J., Song, H.O., Lee, Y.H., Ryu, J.S., Ahn, M.H., 2013. Proliferation of *Toxoplasma gondii* suppresses host cell autophagy. *Korean J. Parasitol.* 51, 279-287.
- Leu, K.L., Hsu, B.D., 2005. A programmed cell disintegration of *Chlorella* after heat stress. *Plant Sci.* 168, 145-152.
- Levine, A., 2002. Regulation of stress responses by intracellular vesicle trafficking?. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 531-535.
- Li, M., Hu, C., Gao, X., Xu, Y., Qian, X., Brown, M.T., Cui, Y., 2009. Genotoxicity of organic pollutants in source of drinking water on microalga *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology* 18, 669-676.
- Li, M., Hu, C., Zhu, Q., Chen, L., Kong, Z., Liu, Z., 2006. Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (*Prymnesiophyceae*). *Chemosphere* 62, 565-572.
- Li, Q., Liu, J., Zhang, L., Liu, Q., 2014. *De novo* transcriptome analysis of an aerial microalga *Trentepohlia jolithus*: pathway description and gene discovery for carbon fixation and carotenoid biosynthesis. *PLoS One*, 9, e108488.
- Li, Y., Han, D., Hu, G., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2010. Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Bioeng.* 107, 258-268.

- Lin, J., Wang, Y., Wang, G., 2006. Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. *J. Plant Physiol.* 163, 731-739.
- Liu, W., Au, D.W.T., Anderson, D.M., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S., 2007. Effects of nutrients, salinity, pH and light: dark cycle on the production of reactive oxygen species in the alga *Chattonella marina*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 346, 76-86.
- Liu, X., Li, W.J., Li, L., Yang, Y., Mao, L.G., Peng, Z., 2014. A label-free electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles for direct detection of atrazine. *Sens. Actuators B* 191, 408-414.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656-666.
- Lloyd, D., Harris, J.C., Biagini, G.A., Hughes, M.R., Maroulis, S., Bernard, C., Wadley, R. B., Edwards, M.R., 2004. The plasma membrane of microaerophilic protists: oxidative and nitrosative stress. *Microbiology* 150, 1183-1190.
- Lloyd, D., Harris, J.C., Maroulis, S., Biagini, G.A., Wadley, R.B., Turner, M.P., Edwards, M.R., 2000. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: oxygen and its reaction products collapse membrane potential and cause cytotoxicity. *Microbiology* 146, 3109-3118.
- Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G., 2009. EU- wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ. Pollut.* 157, 561-568.
- Lopez, D., Casero, D., Cokus, S.J., Merchant, S.S., Pellegrini, M., 2011. Algal functional annotation tool: a web-based analysis suite to functionally interpret large gene lists using integrated annotation and expression data. *BMC Bioinforma.* 12, 282.
- Lorente, C., Causapé, J., Glud, R.N., Hancke, K., Merchán, D., Muñiz, S., Val, J., Navarro, E., 2014. Impacts of agricultural irrigation on nearby freshwater ecosystems: the seasonal influence of triazine herbicides in benthic algal communities. *Sci. Total Environ.* 503-504, 151-158.
- Loseva, N., Gordon, L., Alyabyev, A., Andreyeva, I., Kolesnikov, O., Chernov, V., Kemp, R.B.,

2004. Effect of induced changes in membrane permeability on the defence response of *Chlorella vulgaris* to infection by *Acholeplasma laidlawii*. *Thermochim. Acta* 422, 95-100.
- Lu, Y.C., Yang, S.N., Zhang, J.J., Zhang, J.J., Tan, L.R., Yang, H., 2013. A collection of glycosyl transferases from rice (*Oryza sativa*) exposed to atrazine. *Gene* 531, 243-252.
- Lurling, M., Beekman, W., 2006. Palmelloids formation in *Chlamydomonas reinhardtii*: defence against rotifer predators? *Ann. Limnol.* 42, 65-72.
- Lüring, M., 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 (*Microcystis*). *Chemosphere* 65, 618-626.
- Ma, J., Chen, J., 2005. How to accurately assay the algal toxicity of pesticides with low water solubility. *Environ. Pollut.* 136:, 267-273.
- Ma, J., Wang, S., Wang, P., Ma, L., Chen, X., Xu, R., 2006. Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 456e462.
- Ma, J., Xu, L., Wang, S., Zheng, R., Jin, S., Huang, S., Huang, Y., 2002. Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51,128-132.
- Ma, Q., Wang, J., Lu, S., Lv, Y., Yuan, Y., 2013. Quantitative proteomic profiling reveals photosynthesis responsible for inoculum size dependent variation in *Chlorella sorokiniana*. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 773–784.
- Macinnis-Ng, C.M.O., Ralph, P.J., 2003. Short-term impact and recovery of *Zostera capricorni* photosynthesis after herbicide exposure. *Aquat. Bot.* 76, 1-15.
- Magnusson, M., Heimann, K., Ridd, M., Negri, A.P., 2013. Pesticide contamination and phytotoxicity of sediment interstitial water to tropical benthic microalgae. *Water Res.* 47, 5211–5221.
- Malakof, D., Stokstad, E., 2013. Infographic: Pesticide Planet. *Science* 341, 730-731.
- Mallick, N., Mohn, F.H., 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal- stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 64-69.
- Marchetti, G., Minella, M., Maurino, V., Minero, C., Vione, D., 2013. Photochemical transformation of atrazine and formation of photointermediates under conditions relevant to sunlit surface waters: laboratory measures and modeling. *Wat. Res.* 47, 6211-6222.

- Marschner, H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press., London, GB. pp. 889.
- Martinez, R.S., Di Marzio, W.D., Sáenz, M.E., 2014. Genotoxic effects of commercial formulations of Chlorpyrifos and Tebuconazole on green algae. *Ecotoxicology* 24, 45-54.
- Matamoros, V., Uggetti, E., García, J., Bayona, J.M., 2016. Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: a laboratory scale study. *J. Hazard. Mater.* 301, 197-205.
- Mattoo, A.K., St. John, J.B., Wergin, W.P., 1984. Adaptive reorganization of protein and lipid components in chloroplast membranes as associated with herbicide binding. *J. Cell. Biochem.* 24, 145-163.
- McClure, R., Balasubramanian, D., Sun, Y., Bobrovskyy, M., Sumbly, P., Genco, C.A., Vanderpool, C.K., Tjaden, B., 2013. Computational analysis of bacterial RNA-Seq data. *Nucleic Acids Res.* 41, e140.
- McCord, J.M., 1974. Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185, 529-531.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1988. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic. Biol. Med.* 5, 363-369.
- Mehinto, A.C., Matyniuk, C.J., Spade, D.J., Denslow, N.D., 2012. Applications of next generation sequencing in fish ecotoxicogenomics. *Front. In Genet.* 3, 62.
- Mehler, A.H., 1951. Studies on the reactions of illuminated chloroplasts. 2. Stimulation on inhibition of the reaction with molecular oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* 34, 339-351.
- Melegari, S.P., Perreault, F., Costa, R.H.R., Popovic, R., Matias, W.G., 2013. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 142-143, 431-440.
- 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., Marechal-Drouard, L., Marshall, W.F., Qu, L., Nelson, D.R., Sanderfoot, A.A., Spalding, M.H., Kapitonov, V.V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S.M., Grimwood, J., Schmutz, J., Chlamydomonas Annotation Team, JGI Annotation Team, Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S., Grossman, A.R., 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318, 245-250.
- Minier, C., Galgani, F., Robert, J. M., 1993. In vivo characterization of esterase activity in

- Calothrix PCC 7601, *Haslea ostrearia* and *Prorocentrum micans*. Bot. Mar. 36, 245-252.
- Mitchell, P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature 191, 144-148.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends. Plant. Sci. 7, 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci. 9, 490-498.
- Mofeed, J., Mosleh, Y.Y., 2013. Toxic responses and antioxidative enzymes activity of *Scenedesmus obliquus* exposed to fenhexamid and atrazine, alone and in mixture. Ecotoxicol. Environ. Saf. 95, 234-240.
- Moharikar, S., D'Souza, J.S.D., Kulkarni, A.B., Rao, B.J., 2006. Apoptotic-like cell death pathway is induced in unicellular chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlorophyceae*) cells following uv irradiation: detection and functional analyses. J. Phycol. 42, 423-433.
- Moharikar, S., D'Souza, J.S., Rao, B.J., 2007. A homologue of the defender against the apoptotic death gene (*dad1*) in UV-exposed *Chlamydomonas* cells is downregulated with the onset of programmed cell death. J. Biosci. 32, 261-270.
- Møller, I.M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52, 561-591.
- Monsinjon, T., Knigge, T., 2007. Proteomic applications in ecotoxicology. Proteomics 7, 2997-3009.
- Moreland, D.E., 1980. Mechanism of action of herbicides. Annu. Rev. Plant Physiol. 31, 597-638.
- Moreno-Garrido, I., Lubian, L.M., Soares, A., 2000. Influence of cellular density on determination of EC₅₀ in microalgal growth inhibition tests. Ecotoxicol. Environ. Saf. 47, 112-116.
- Moro, I., Matozzo, V., Piovan, A., Moschin, E., Vecchia, F.D., 2014. Morpho-physiological effects of ibuprofen on *Scenedesmus rubescens*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 38, 379-387.
- Mouchet, F., Cren, S., Cunieng, C., Deydier, E., Guilet, R. y Gauthier, L., 2007. Assessment of

- lead ecotoxicity in water using the amphibian larvae (*Xenopus laevis*) and preliminary study of its immobilization in meat and bone meal combustion residues. *BioMetals* 20, 113-127.
- Mullaney, P.F., Van Dilla, M.A., Coulter, J.R., 1969. Cell sizing: a light scattering photometer for rapid volume determination. *Rev. Sci. Instrum.* 40, 1029e1034.
- Müntz, K., 2007. Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. *J. Exp. Bot.* 58, 2391-2407.
- Nakajima, Y., Yoshida, S., Ono, T., 1996. Differential effects of urea triazine-type and phenol-type photosystem II inhibitors on inactivation of the electron transport and degradation of the D1 protein during photoinhibition. *Plant Cell Physiol.* 37, 673-680.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867-880.
- Nancharaiah, Y.W., Rajadurai, M., Venugopalan, V.P., 2007. Single cell level microalgal ecotoxicity assessment by confocal microscopy and digital image analysis. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2617-2621.
- Neale, P.J., Cullen, J.J., Yentsch, C.M., 1989. Bio-optical inferences from chlorophyll *a* fluorescence: what kind of fluorescence is measured by flow cytometry? *Limnol. Oceanogr.* 34, 1739-1748.
- Nedelcu, A.M., 2006. Evidence for p53-like-mediated stress responses in green algae. *FEBS Lett.* 580, 3013-3017.
- Nestler, H., Groh, K.J., Schönenberger, R., Eggen, R.I.L., Suter, M.J.F., 2012. Linking proteome responses with physiological and biochemical effects in herbicide-exposed *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Proteome* 75, 5370-5385.
- Nie, X., Gu, J., Lu, J., Pan, W., Yang, Y., 2009. Effects of norfloxacin and butylated hydroxyanisole on the freshwater microalga *Scenedesmus obliquus*. *Ecotoxicology* 18, 677-684.
- Niitsu, R., Kanazashi, M., Matsuwaki, I., Ikegami, Y., Tanoi, T., Kawachi, M., Watanabe, M.M., Kato, M., 2012. Changes in the hydrocarbon-synthesizing activity during growth of *Botryococcus braunii* B70. *Bioresour. Technol.* 109, 297- 299.
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., Murata, N., 2005. Inhibition of the repair of Photosystem II by oxidative stress in cyanobacteria. *Photosyn. Res.* 84, 1-7.

- Nobre, B.P., Villalobos, F., Barragan, B.E., Oliveira, A.C., Batista, A.P., Marques, P.A., Mendes, R.L., Sovova, H., Palavra, A.F., Gouveia, L., 2013. A biorefinery from *Annochloropsis* sp. microalga extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass. *Bioresour. Technol.* 135, 128-136.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and Glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249-279.
- Nookaew, I., Papini, M., Pornputtpong, N., Scalcinati, G., Fagerberg, L., Uhlén, M., Nielsen, J., 2012. A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: A case study in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 40, 10084-10097.
- OECD, 2011. Alga, Growth Inhibition Test (201). OECD Guideline for Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- OECD. Dataset. Edition of the OECD Environmental Database (2013). Available online: stats.oecd.org (accessed on 18 August 2017).
- Oettmeier, W., 1992. Herbicides of photosystem II. *Top. Photosyn.* 11, 349-408.
- Ormerod, M.G. (2008). Flow cytometry: a basic introduction. <http://flowbook.denovosoftware.com/>. 116 pp.
- Ozsolak, F., Milos, P.M., 2011. Transcriptome profiling using single-molecule direct RNA sequencing. *Methods Mol. Biol.* 733, 51-61.
- Pace, E., Pompili, L., Margonelli, A., Giardi, P., Giardi, M.T., 2001. Pulse-chase experiments with [³⁵S]Methionine show D1 reaction II protein turnover in variously herbicide tolerant species. *Pestic. Biochem. Physiol.* 69, 92-99.
- Palmeira, C.M., Moreno, A.J., Madeira, V.M.C., 1995. Mitochondrial bioenergetics is affected by the herbicide paraquat. *Biochim. Biophys. Acta* 1229, 187-192.
- Paniagua-Chávez, C.G., Jenkins, J., Segovia, M., Tiersch, T.R., 2006. Assessment of gamete quality for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by use of fluorescent dyes. *Cryobiology* 53, 128-138.
- Papadimitriou, K., Pratsinis, H., Nebe-von-Caron, G., Kletsas, D., Tsakalidou, E., 2006. Rapid assessment of the physiological status of *Streptococcus macedonicus* by flow cytometry and fluorescent probes. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 197-205.

- Park, J.B., Craggs, R.J., 2010. Wastewater treatment and algal production in high rate algal ponds with carbon dioxide addition. *Water Sci. Technol.* 61, 633-639.
- Pascoe, D., Wenzel, A., Janssen, C., Girling, A.E., Jüttner, I., Fliedner, A., Blockwell, S.J., Maund, S.J., Taylor, E.J., Diecrich, M., Persoone, G., Verhelst, P., Stephenson, R.R., Crossland, N.O., Mitchell, G.C., Pearson, N., Tattersfield, L., Lay, J.P., Peither, A., Neumeier, B. y Velletti, A.R., 2000. The development of toxicity tests for freshwater pollutants and their validation in stream and pond mesocosms. *Water Res.* 34, 2323-2329.
- Pawlowski, J., Holzmann, M., Fahrni, J.F., Hallock, P., 2001. Molecular identification of algal endosymbionts in large miliolid foraminifera: 1. Chlorophytes. *J. Euk. Microbiol.* 48, 362-367.
- Peperzak, L., Brussaard, C.P.D., 2011. Flow cytometric applicability of fluorescent vitality probes on phytoplankton. *J. Phycol.* 47, 692e702.
- Pereira, J.L., Antunes, S.C., Castro, B.B., Marques, C.R., Goncalves, A.M.M., Goncalves, F., Pereira, R., 2009. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulations versus active ingredient. *Ecotoxicology* 18, 455-463.
- Pérez-Pérez, M.E., Florencio, F.J., Crespo, J.L., 2010. Inhibition of TOR signalling and stress activate autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 152, 1874-1888.
- Pérez-Pérez, M.E., Lemaire, S.D., Crespo, J.L., 2012. Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae. *Plant Physiol.* 160, 156-164.
- Perl-Treves, R., Perl, A., 2002. Oxidative stress: an introduction. In: *Oxidative stress in plants*. Inzé, D., Van Montagu, M. (Ed.). Taylor & Francis, London. pp. 1-32.
- Perreault, F., Oukarroum, A., Melegari, S.P., Matias, W.G., Popovic, R., 2012. Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere* 87, 1388-1394.
- Petersen, S., Kusk, K.O., 2000. Photosynthesis tests as an alternative to growth tests for hazard assessment of toxicant. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 152-157.
- Peterson, S.M., Stauber, J.L., 1996. New algal enzyme bioassay for the rapid assessment of aquatic toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 750-757.
- Pham, N., Robinson, B.H., Hedley, D.W., 2000. Simultaneous detection of mitochondrial

- respiratory chain activity and reactive oxygen in digitonin-permeabilized cells using flow cytometry. *Cytometry* 41, 245-251.
- Plieth, C., 2005. Calcium: just another regulator in the machinery of life? *Ann. Bot.* 96, 1-8.
- Pokora, W., Tukaj, Z., 2010. The combined effect of anthracene and cadmium on photosynthetic activity of three *Desmodesmus (Chlorophyta)* species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1207-1213.
- Poot, M., Pierce, R.H., 2001. Analysis of mitochondria by flow cytometry. In: *Cytometry. Part B.* Darzynkiewicz, Z., Crissman, H.A., Robinson, J.P. (Ed.). Academic Press, London. pp. 496-512.
- Posthuma, L., de Zwart, D., 2012. Predicted mixture toxic pressure relates to observed fraction of benthic macrofauna species impacted by contaminant mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 2175–2188.
- Powles, S.B., Preston, C., Bryan, I.B., Jutsum, A.R., 1997. Herbicide resistance: impact and management. *Adv. Agron.* 58, 57-93.
- Poynton, H.C., Vulpe, C.D., 2009. Ecotoxicogenomics: emerging technologies for emerging contaminants. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 45, 83-96.
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Abalde, J., Cid, A., 2009a. Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat. *Environ. Int.* 35, 240-247.
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2015. Suitability of cytotoxicity endpoints and test microalgal species to disclose the toxic effect of common aquatic pollutants. *Ecotox. Environ. Safe.* 114, 117-125.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2009b. The herbicide paraquat induces alterations in the elemental and biochemical composition of non-target microalgal species. *Chemosphere* 76, 1440-1444.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2011. Characterization of cell response in *Chlamydomonas moewusii* cultures exposed to the herbicide paraquat: Induction of chlorosis. *Aquat. Toxicol.* 102, 10-17.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2012b. Screening acute cytotoxicity biomarkers using a microalga as test organism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 86, 219-226.

- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Suárez-Brégua, P., Cid, A., 2012a. Flow cytometric analysis to evaluate physiological alterations in herbicide-exposed *Chlamydomonas moewusii* cells. *Ecotoxicology* 21, 409-420.
- Price, A.H., Taylor, A., Ripley, S.J., Griffiths, A., Trewavas, A.J., Knight, M.R., 1994. Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* 6, 1301-1310.
- Qian, H., Chen, W., Li, J., Wang, J., Zhou, Z., Liu, W., Fu, Z., 2009. The effect of exogenous nitric oxide on alleviating herbicide damage in *Chlorella vulgaris*. *Aquat. Toxicol.* 92, 250-257.
- Qian, H., Pan, X., Chen, J., Zhou, D., Chen, Z., Zhang, L., Fu, Z., 2012. Analyses of gene expression and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* reveal the phytotoxicities of three environmental pollutants. *Ecotoxicology* 21, 847-859.
- Qian, H., Sheng, G.D., Liu, W., Lu, Y., Liu, Z., Fu, Z., 2008. Inhibitory effects of atrazine on *Chlorella vulgaris* as assessed by real-time polymerase chain reaction. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 182-187.
- Qian, H., Tsuji, T., Endo, T., Sato, F., 2014. PGR5 and NDH pathways in photosynthetic cyclic electron transfer respond differently to sublethal treatment with photosystem-interfering herbicides. *J. Agric. Food Chem.* 62, 4083-4089.
- Qu, B., Li, Q.T., Wong, K.P., Tan, T.M.C., Halliwell, B., 2001. Mechanism of clofibrate hepatotoxicity: mitochondrial damage and oxidative stress in hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 659-669.
- Rabinovitch, P.S., June, C.H., 1990. Intracellular ionized calcium, membrane potential, and pH. En: *Flow cytometry. A practical approach.* Ormerod, M. G. (Ed.). Oxford University Press, Oxford. pp. 161-185.
- Raha, S., Robinson, B.H., 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.* 25, 502-508.
- Ramagli, L.S., Rodriguez, L.V., 1985. Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* 6, 559-563.
- Ramundo, S., Casero, D., Mühlhaus, T., Hemme, D., Sommer, F., Crèvecoeur, M., Rahire, M., Schroda, M., Rusch, J., Goodenough, U., Pellegrini, M., Perez-Perez, M.E., Crespo, J.L., Schaad, O., Civic, N., Rochaix, J.D., 2014. Conditional Depletion of the

- Chlamydomonas* Chloroplast ClpP Protease Activates Nuclear Genes Involved in Autophagy and Plastid Protein Quality Control. *The Plant Cell*, 26, 2201-2222.
- Real, M., Munoz, I., Guasch, H., Navarro, E., Sabater, S., 2003. The effect of copper exposure on a simple aquatic food chain. *Aquat. Toxicol.* 63, 283-291.
- Regel, R.H., Brookes, J.D., Ganf, G.G., Griffiths, R.W., 2004. The influence of experimentally generated turbulence on the Mash01 unicellular *Microcystis aeruginosa* strain. *Hydrobiologia* 517, 107-120.
- Relyea, R.A., 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol. Appl.* 15,618-627.
- Richardson, S.D., Ternes, T.A., 2011. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* 83, 4614-4648.
- Rioboo, C., 2008. Toxicidad ejercida por un herbicida de tipo triazina sobre la microalga dulceacuícola *Chlorella vulgaris* Beijerinck: alteraciones fisiológicas y estructurales. Tesis doctoral. pp. 359. Universidade da Coruña, A Coruña.
- Rioboo, C., Gonzalez-Barreiro, O., Abalde, J., Cid, A., 2011. Flow cytometric analysis of the encystment process induced by paraquat exposure in *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*). *Eur. J. Phycol.* 46, 89–97.
- Rioboo, C., Gonzalez, O., Herrero, C., Cid, A., 2002. Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. *Aquat. Toxicol.* 59, 225–235
- Rioboo, C., O'Connor, J.E., Prado, R., Herrero, C., Cid, A., 2009. Cell proliferation alterations in *Chlorella* cells under stress conditions. *Aquat. Toxicol.* 94, 229–237.
- Rioboo, C., Prado, R., Herrero, C., Cid, A., 2007. Population growth study of the rotifer *Brachionus sp.* fed with triazine-exposed microalgae. *Aquat. Toxicol.* 83, 247-253.
- Rosenwasser, S., Graff van Creveld, S., Schatz, D., Malitsky, S., Tzfadia, O., Aharoni, A., Levi, Y., Gabashvili, A., Feldmesser, E., Vardi, A., 2014. Mapping the diatom redox-sensitive proteome provides insight into response to nitrogen stress in the marine environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111,2740-2745.
- Roxas, V.P., Smith, R.K., Allen, E.R., Allen, R.D., 1997. Overexpression of glutathione-S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat. Biotechnol.* 15, 988-991.

- Royall, J.A., Ischiropoulos, H., 1993. Evaluation of 20,70-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 302, 348-335
- Ruiz, J., Álvarez, P., Arbib, Z., Garrido, C., Barragán, J., Perales, J.A., 2011. Effect of nitrogen and phosphorus concentration on their removal kinetic in treated urban wastewater by *Chlorella Vulgaris*. *Int. J. Phytoremediat.* 13, 884-896.
- Rutherford, A.W., Krieger-Liszkay, A., 2001. Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends Biochem. Sci.* 6, 648-653
- Saad, S.S.T., Hamza, M., Bahr, M.H., Masoud, S.I., 2016. Nitric oxide is involved in ibuprofen preemptive analgesic effect in the plantar incisional model of postsurgical pain in mice. *Neurosci. Lett.* 614, 33-38.
- Sabater, C., Carrasco, J.M., 2001. Effects of pyridaphenthion on growth of five freshwater species of phytoplankton. A laboratory study. *Chemosphere* 44, 1775-1781.
- Sabatini, S.E., Juárez, A.B., Eppis, M.R., Bianchi, L., Luquet, C.M., Ríos de Molina, M.C., 2009. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1200-1206.
- Sakamoto, K., Baba, M., Suzuki, I., Watanabe, M.M., Shiraiwa, Y., 2012. Optimization of light for growth, photosynthesis, and hydrocarbon production by the colonial microalga *Botryococcus braunii* BOT-22. *Bioresour. Technol.* 110, 474-479.
- Saladin, G., Magné, C., Clément, C., 2003. Impact of flumioxazin herbicide on growth and carbohydrate physiology in *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Rep.* 21, 821-827.
- Sanchez, D., Houde, M., Douville, M., De Silva, A.O., Spencer, C., Verreault, J., 2015. Transcriptional and cellular responses of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* to perfluoroalkyl phosphonic acids. *Aquat. Toxicol.* 160, 31-38.
- Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J.F., 1999. Communicating with calcium. *Plant Cell* 11, 691-706.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., Harper, J.F., 2002. Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell Supplement* S401-S417.
- Sanmartin, M., Jaroszewski, L., Raikhel, N., Rojo, E., 2005. Caspases: regulating death since the origin of life. *Plant Physiol.* 137, 841-847.

- Sathasivam, R., Ebenezer, V., Guo, R., Ki, J.S., 2016. Physiological and biochemical responses of the freshwater green algae *Closterium ehrenbergii* to the common disinfectant chlorine. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 133, 501-508.
- Schmidt, M., Geszner, G., Luff, M., Heiland, I., Wagner, V., Kaminski, M., Geimer, S., Eitzinger, N., Reizenweber, T., Voytsekh, O., Fiedler, M., Mittag, M., Kreimer, G., 2006. Proteomic analysis of the eyespot of *Chlamydomonas reinhardtii* provides novel insights into its components and active movements. *Plant Cell* 18, 1908-1930.
- Schnürer, J., Rosswall, T., 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1256-1261.
- Schreiber, U., Quayle, P., Schmidt, S., Escher, B.I., Mueller, J.F., 2007. Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwell chlorophyll fluorescence imaging. *Biosens. Bioelectron.* 22, 2554-2563.
- Scott, J.A., Khaw, B., Homey, C.J., Rabito, C.A., 1987. Oxygen radicals alter the cell membrane potential in a renal cell line (LLC- PK1) with differentiated characteristics of proximal tubular cells *Biochim. Biophys. Acta* 897, 25-32.
- Scott, J.A., Rabito, C.A., 1988. Oxygen radicals and plasma membrane potential. *Free Radical Biol. Med.* 5, 237-246.
- Segner, H., 2011. Moving beyond a descriptive aquatic toxicology: The value of biological process and trait information. *Aquat. Toxicol.* 105, 50-55.
- Seoane, M., Esperanza, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2017. Flow cytometric assay to assess short-term effects of personal care products on the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Chemosphere* 171, 339-347.
- Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2014. Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. *Marine Environ. Res.* 101, 1-7.
- Shapiro, H.M., 1995. *Practical Flow Cytometry*. 3rd edition. Willey-Lyss Inc., New York. pp 542.
- Shehata, S.A., El-Dib, M.A., Abou-Waly, H.F., 1997. Effect of certain herbicides on the growth of freshwater algae. *Water Air Soil Poll.* 100, 1-12.
- Shendure, J., Ji, H., 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 26, 1135-1145.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K.,

2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* 53, 1305-1319.
- Singh, L.J., Tiwari, D.N., 1988. Effects of selected rice-field herbicides on photosynthesis, respiration, and nitrogen assimilating enzyme systems of paddy soil diazotrophic cyanobacteria. *Pest. Biochem. Physiol.* 31, 120-128.
- Singh, N.K., Dhar, D.W., 2010. Cyanobacterial reclamation of salt-Affected Soil. In: Lichtfouse, E. (Ed.), *Genetic Engineering, Biofertilisation, Soil Quality and Organic Farming*. Springer Netherlands, Dordrecht, the Netherlands, pp. 243-275.
- Sivaguru, M., Yamamoto, Y., Rengel, Z., Ahn, S.J., Matsumoto, H., 2005. Early events responsible for aluminium toxicity symptoms in suspension-cultured tobacco cells. *New Phytol.* 165, 99-109.
- Sjollema, S.B., Martínez-garcía, G., van der Geest, H.G., Kraak, M.H.S., Booij, P., Vethaak, A.D., Admiraal, W., 2014. Hazard and risk of herbicides for marine microalgae. *Environ. Pollut.* 187, 106-111.
- Smiley, S.T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T.W., Steele, G. D.J., Chen, L.B., 1991. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *PNAS* 88, 3671-3675.
- Smirnoff, N., 2000. Ascorbic acid: Metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 229-235.
- Sobrino, C., Montero, O., Lubián, L.M., 2004. UV-B radiation increases cell permeability and damages nitrogen incorporation mechanism in *Nannochloropsis gaditana*. *Aquat. Sci.* 66, 421-429.
- Sobrino, C., Montero, O., Lubián, L.M., 2005. Effect of UV-A and UV-B on diel patterns of growth and metabolic activity in *Nannochloris atomus* cultures assessed by flow cytometry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 293, 29-35.
- Sohal, R.S., 2002. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 37-44.
- Solomon, K.R., 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North America surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 31e76.
- Soltani, N., Mashhadi, H.R., Mesgaran, M.B., Cowbrough, M., Tardif, F. J., Chandler, K., Nurse, R.E., Swanton, C.J., Sikkema, P.H., 2011. The effect of residual corn herbicides on

- injury and yield of soybean seeded in the same season. *Can. J. Plant Sci.* 91, 571-576.
- Soneson, C., Delorenzi, M., 2013. A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *BMC Bioinformatics.* 14, 91.
- Song, Y., Zhu, L.S., Xie, H., Wang, J., Wang, J.H., Liu, W., Gong, X.L., 2009. Effects of atrazine on DNA damage and antioxidative enzymes in *Vicia faba*. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 1055-1062.
- Soupene, E., Inwood, W., Kustu, S., 2004. Lack of the Rhesus protein Rh1 impairs growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* at high CO₂. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 7787-7792.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87-96.
- Sprick, M.R., Walczak, H., 2004. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1644, 125-132.
- Spurgeon, D.J., Jones, O.A.H., Dorne, J.L.C.M., Svendsen, C., Swain, S., Stürzenbaum, S.R., 2010. Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Sci. Total Environ.* 408, 3725-3734.
- Starr, J.L., Glotfelty, D.E., 1990. Atrazine and bromide movement through a silty loam soil. *J. Environ. Qual.* 19, 552-558.
- Stauber, E.J., Hippler, M., 2004. *Chlamydomonas reinhardtii* proteomics. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 989-1001.
- Stauber, J.L., Franklin, N.M., Adams, M.S., 2002. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. *Trends in Biotechnol.* 20, 141-143.
- Stolz, P., Obermayer, B., 2005. Manufacturing microalgae for skin care. *Cosmetics Toiletries* 120, 99-106.
- Storck, V., Karpouzas, D.G., Martin-Laurent, F., 2017. Towards a better pesticide policy for the European Union. *Sci. Total Environ.* 575, 1027-1033.
- Storms, R., Hastings, P.J., 1977. A fine structure analysis of meiotic pairing in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Exp. Cell Res.* 104, 39-46.
- Strickland, J.D., Parsons, T.R., 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Board Can.* 167, 201-203.

- Strom, D., Ralph, P.J., Stauber, J.L., 2009. Development of a toxicity identification evaluation protocol using chlorophyll-*a* fluorescence in a marine microalga. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 30-38.
- Subbaiah, C.C., Bush, D.S., Sachs, M.M., 1998. Mitochondrial contribution to the anoxic Ca²⁺ signal in maize suspension-cultured cells. *Plant Physiol.* 118, 759-771.
- Subramanian, V., Dubini, A., Astling, D.P., Laurens, L.M.L., Old, W.M., Grossman, A.R., Seibert, M., 2014. Profiling *Chlamydomonas* metabolism under dark, anoxic H₂-producing conditions using a combined proteomic, transcriptomic, and metabolomic approach. *J. Proteome Res.* 13, 5431-5451.
- Sun, Q.P., Guo, Y., Sun, Y., Sun, D.Y., Wang, X.J., 2006. Influx of extracellular Ca²⁺ involved in jasmonic-acid-induced elevation of [Ca²⁺]_(cyt) and JR1 expression in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* 119, 343-350.
- Suresh Kumar, K., Dahms, H.U., Lee, J.S., Kim, H.C., Lee, W.C., Shin, K.H., 2014. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll *a* fluorescence. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 51-71.
- Suzuki, M., Furukawa, S., Kuramori, C., Sawa, C., Kabe, Y., Nakamura, M., Sawada, J., Yamaguchi, Y., Sakamoto, S., Inouye, S. y Handa, H., 2008. Development of a chemical screening system using aequorin-fused protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368, 600-605.
- Suzuki, T., Ezure, T., Yamaguchi, T., Domen, H., Ishida, M., Schmidt, W., 2000. Stimulatory effect of procaine on the growth of several microalgae and cyanobacteria. *J. Pharm. Pharmacol.* 52, 243-251.
- Sweetlove, L.J., Foyer, C.H., 2004. Roles for reactive oxygen species and antioxidants in plant mitochondria. In Day, D.A., Millar, A.H., Whelan, J., eds, *Plant Mitochondria: From Genome to Function*, Vol 1, *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp 307-320.
- Sze, H., Liang, F., Hwang, I., Curran, A.C., Harper, J.F., 2000. Diversity and regulation of plant Ca²⁺ pumps: insights from expression in yeast. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 433-462.
- Tadonl  k  , R.D., LeBerre, B., Perreau, F., Humbert, J., 2009. Responses of lake bacterioplankton activities and composition to the herbicide diuron. *Aquat. Toxicol.* 94,

103-113.

- Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J.D. y Herman, B., 1999. Measurement of intracellular calcium. *Physiol. Rev.* 79, 1089-1125.
- Tang, J.X., Hoagland, K.D., Siegfried, B.D., 1997. Differential toxicity of atrazine to selected freshwater algae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 631-637.
- Tarpey, M.M., Fridovich, I., 2001. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Cir. Res.* 89, 224-236.
- Taylor, A.R., Manison, N., Fernandez, C., Wood, J., Brownlee, C., 1996. Spatial organization of calcium signaling involved in cell volume control in the *Fucus* rhizoid. *Plant Cell* 8, 2015-2031.
- Thom, R., Dixon, D., Edwards, R., Cole, D., Laphorn, A., 2001. Structure determination of zeta class glutathione transferase from *Arabidopsis thaliana*. *Chem. Biol. Interact.* 133, 55-57.
- Törnqvist, R., Jarsjö, J., Karimov, B., 2011. Health risks from large-scale water pollution: trends in Central Asia. *Environ. Int.* 37, 435-442.
- Torres, E., Cid, A., Fidalgo, P., Abalde, J., 1997a. Rapid assay for the analysis of class III metallothioneins by capillary zone electrophoresis in crude extracts of microalgal cells exposed to cadmium. *J. Chromatogr. A* 775, 339-347.
- Torres, E., Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C., Abalde, J., 1997b. Long-chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Aquat. Toxicol.* 39, 231-246.
- Torres, E., Cid, A., Herrero, C., Abalde, J., 2000. Effect of cadmium on growth, ATP content, carbon fixation and ultrastructure in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Water Air Soil Pollut.* 117, 1-14.
- Torres, E., Mera, R., Herrero, C., Abalde, J., 2014. Isotherm studies for the determination of Cd (II) ions removal capacity in living biomass of a microalga with high tolerance to cadmium toxicity. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 12616-12628.
- Truhaut, R., 1977. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1977, 151-173.
- Tsien, R.Y., Pozzan, T., Rink, T.J., 1982. Calcium homeostasis in intact lymphocytes:

- cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell. Biol.* 94, 325-334.
- Tsuji, H., Nakazono, M., Saisho, D., Tsutsumi, N., Hirai, A., 2000. Transcript levels of the nuclear-encoded respiratory genes in rice decrease by oxygen deprivation: evidence for involvement of calcium in expression of the alternative oxidase 1a gene. *FEBS Lett* 471, 201-204.
- Tucker, T., Marra, M., Friedman, J.M., 2008. Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *Am. J. Hum. Genet.* 85, 142-154.
- Tukaj, Z., Matusiak-mikulin, K., Lewandowska, J., Szurkowski, J., 2003. Changes in the pigment patterns and the photosynthetic activity during a light-induced cell cycle of the green alga *Scenedesmus armatus*. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 337-344.
- Udomsinprasert, R., Pongjaroenkit, S., Wongsantichon, J., Oakley, A.J., Prapanthadara, L., Wilce, M.C.J., Ketterman, A.J., 2005. Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme. *Biochem. J.* 388, 763-771.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency), 2011. Atrazine ecological exposure monitoring program data. Washington DC.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency), 2012. Atrazine updates. Washington DC.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency), 2013. Risk Assessment. Washington DC.
- Vacca, R.A., Pinto, M.C. De, Valenti, D., Passarella, S., Marra, E., de Gara, L., 2004. Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in Tobacco bright-yellow 2 Cells. *Plant Physiol.* 134, 1100-1112.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178-189.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178-189.
- Van Aken, O., Van Breusegem, F., 2015. Licensed to Kill: Mitochondria, Chloroplasts, and Cell

- Death. Trends Plant Sci. 20, 754-766.
- Van den Hoek, C., Mann, D.G. y Jans, H.M., 1995. Algae. An Introduction to Phycology. Cambridge Univ. Press, New York. pp 623.
- van der Heever, J.A., Grogelaar, J.U., 1998. In vivo chlorophyll a fluorescence of *Selenastrum capricornutum* as a screening bioassay in toxicity studies. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 281-286.
- Van Doorn, W.G., Woltering, E.J., 2005. Many ways to exit? Cell death categories in plants. Trends Plant Sci. 10, 117-122.
- Van Loo, G., Van Gorp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S., Rodriguez, I., Alnemri, E., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Vandenameele, P., 2002. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. Cell Death Differ. 9, 20-26.
- Van Verk, M.C., Hickman, R., Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., 2013. RNA-Seq: revelation of the messengers. Trends Plant Sci. 18, 175-179.
- van Wezel, A.P., van Vlaardingen, P., 2004. Environmental risk limits for antifouling substances. Aquat. Toxicol. 66, 427-444.
- Vanacker, H., Sandalio, L., Jiménez, A., Palma, J.M., Corpas, F.J., Meseguer, V., del Río, L.A., 2006. Roles for redox regulation in leaf senescence of pea plants grown on different sources of nitrogen nutrition. J. Exp. Bot. 57, 1735-1745.
- Vavilala, S.L., Gawde, K.K., Sinha, M., D 'souza, J.S., 2015. Programmed cell death is induced by hydrogen peroxide but not by excessive ionic stress of sodium chloride in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Eur. J. Phycol. 50, 422-438.
- Vavilala, S.L., Sinha, M., Gawde, K.K., Shirolkar, S.M., D'Souza, J.S., 2016. KCl induces a caspase-independent programmed cell death in the unicellular green chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlorophyceae*). Phycologia 55, 378-392.
- Vavilin, D.V., Ducruet, J.M., Matorin, D.N., Venediktov, P.S., Rubin, A.B., 1998. Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. J. Photochem. Photobiol. 42, 233-239.
- Vega, J.M., Garbayo, I., Domínguez, M.J., Vígara, J., 2006. Effect of abiotic stress on photosynthesis and respiration in *Chlamydomonas reinhardtii*: Induction of oxidative

- stress. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 163-167.
- Veldhuis, M.J.W., Kraay, G.W., 2000. Application of flow cytometry in marine phytoplankton research: current applications and future perspectives. *Sci. Mar.* 64, 121-134.
- Vener, A.V., 2007. Environmentally modulated phosphorylation and dynamics of proteins in photosynthetic membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 449-457.
- Vicente, J.A.F., Peixoto, F., Lopes, M.L., Madeira, V.M.C., 2001. Differential sensitivities of plant and animal mitochondria to the herbicide paraquat. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15, 322-330.
- Villeneuve, D.L., Garcia-Reyero, N., 2011. Vision & strategy predictive ecotoxicology in the 21st century. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1-8.
- von Dassow, P., Ogata, H., Probert, I., Wincker, P., Da Silva, C., Audic, S., Claverie, J.M., de Vargas, C., 2009. Transcriptome analysis of functional differentiation between haploid and diploid cells of *Emiliana huxleyi*, a globally significant photosynthetic calcifying cell. *Genome Bio.* 10, R114.
- Vonberg, D., Vanderborght, J., Cremer, N., Putz, T., Herbst, M., Vereecken, H., 2013. 20 years of long-term atrazine monitoring in a shallow aquifer in western Germany. *Wat. Res.* 50, 294-306.
- Vonshak, A., 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida, pp. 117-145.
- Wakabayashi, K., Böger, P., 2004. Phytotoxic sites of action for molecular design of modern herbicides (part 1): the photosynthetic electron transport system. *Weed Biol. Manag.* 4, 8-18.
- Wallace, D.C., 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39, 359-407.
- Walrand, S., Valeix, S., Rodríguez, C., Ligot, P., Chassagne, J., Vasson, M., 2003. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin. Chim. Acta* 331, 103-110.
- Wang, H., Alvarez, S., Hicks, L.M., 2012. Comprehensive comparison of iTRAQ and label-free LC-based quantitative proteomics approaches using two *Chlamydomonas reinhardtii* strains of interest for biofuels engineering. *J. Proteome Res.* 11, 487-501.

- Wang, T., Chen, L., Wu, Y., Wang, R., 2008. Potential cytoprotection: antioxidant defence by caffeic acid phenethyl ester against free-radical induced damage of lipids, DNA and proteins. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 86, 279-287.
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57-63.
- Wanner, U., Egli, T., 1990. Dynamics of microbial-growth and cell composition in batch culture. *FEMS Microbiol. Rev.* 75, 19-44.
- Warren, N., Allan, I.J., Carter, J.E., House, W.A., Parker, A., 2003. Pesticides and other microorganic contaminants in freshwater sedimentary environments—a review. *Appl. Geochem.* 18, 159-194.
- Wase, N., Black, P.N., Stanley, B.A. and DiRusso, C.C., 2014. Integrated quantitative analysis of nitrogen stress response in *Chlamydomonas reinhardtii* using metabolite and protein profiling. *J. Proteome Res.* 13, 1373-1396.
- Webb, A.A.R., Taylor, J.E., McAinsh, M.R., Hetherington, A.M., 1996. Calcium ions as intracellular second messenger in plants. *Adv. Bot. Res.* 22, 45-96.
- Wei, M.K., Wu, Q.P., Huang, Q., Zhang, J.M., 2008. Plasma membrane damage to *Candida albicans* caused by chlorine dioxide (ClO₂) *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 67-73.
- Weiner, A.J., Delorenzo, M.E., Fulton, M.H., 2004. Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. *Aquat. Toxicol.* 68, 121-128.
- Weir, I.E., Pham, N.A., Hedley, D.W., 2003. Oxidative stress is generated via the mitochondrial respiratory chain during plant cell apoptosis. *Cytometry A* 54A, 109-117.
- Wetmore, B.A., Merrick, B.A., 2004. Toxicoproteomics: proteomics applied to toxicology and pathology. *Toxicol Pathol.* 32, 619-642.
- White, E., Lowe, S.W., 2009. Eating to exit: autophagy-enabled senescence revealed. *Genes Dev.* 23, 784-787.
- White, P.J., 2000. Calcium channels in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 171-189.
- Wickens, H.J., Pinney, R.J., Mason, D.J., Gant, V.A., 2000. Flow cytometric investigation of filamentation, membrane patency, and membrane potential in *Escherichia coli* following ciprofloxacin exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 682-687.

- Wilhem, J., Vytasek, R., Ostádalová, I., Vajner, L., 2009. Evaluation of different methods detecting intracellular generation of free radicals. *Mol. Cell Biochem.* 328, 167-176.
- Wong, P.K., 2000. Effects of 2, 4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere* 41,177-182.
- Wu-Hsiung, H., Yahong, W., Askari, A., 1992. (Na⁺⁺K⁺)-ATPase: inactivation and degradation induced by oxygen radicals. *Int. J. Biochem.* 24, 621-626.
- Xia, J., 2005. Response of growth, photosynthesis and photoinhibition of the edible cyanobacterium *Nostoc sphaeroides* colonies to thiobencarb herbicide. *Chemosphere* 59, 561-566.
- Xiong, Y., Contento, A.L., Nguyen, P.Q., Bassham, D.C., 2007. Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143, 291-299.
- Yang, S., Guarnieri, M. T., Smolinski, S., Ghirardi, M., Pienkos, P. T. 2013. *De novo* transcriptomic analysis of hydrogen production in the green alga *Chlamydomonas moewusii* through RNA-Seq. *Biotechnol. Biofuels* 6, 118.
- Yang, S., Wu, R.S.S., Kong, R.Y.C., 2002. Physiological and cytological responses of the marine diatom *Skeletonema costatum* to 2,4-dichlorophenol. *Aquat. Toxicol.* 60, 33-41.
- Yao, N., Bartholomew, J.E., James, M., Greenberg, J.T., 2004. The mitochondrion: an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 40, 596-610.
- Yordanova, Z.P., Woltering, E.J., Kapchina-Toteva, V.M., Iakimova, E.T., 2013. Mastoparan-induced programmed cell death in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ann. Bot.* 111, 191-205.
- Yoshimura, T., Okada, S., Honda, M., 2013. Culture of the hydrocarbon producing microalga *Botryococcus braunii* strain Showa: optimal CO₂, salinity, temperature, and irradiance conditions. *Bioresour. Technol.* 133, 232-239.
- Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Groni, H., Marchand, C. H., Puppo, C., Gontero, B., Cassier-Chauvat, C., Decottignies, P., Lemaire, S.D., 2012. Glutathionylation in the Photosynthetic Model Organism *Chlamydomonas reinhardtii*: A Proteomic Survey. *Mol. Cell. Proteomics* 11, M111.014142-M111.014142.
- Zbigniew, T., Wojciech, P., 2006. Individual and combined effect of anthracene cadmium, and

- chloridazone on growth and activity of SOD isoforms in three *Scenedesmus species*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 323-331.
- Zer, H., Ohak, I., 1995. Photoinactivation of photosystem II induces changes in the photochemical reaction center II abolishing the regulatory role of the Qe site in the D1 protein degradation. *Eur. J. Biochem.* 453, 448-453.
- Zhang, J.J., Zhou, Z.S., Song, J.B., Liu, Z.P., Yang, H., 2012. Molecular dissection of atrazine-responsive transcriptome and gene networks in rice by high-throughput sequencing. *J. Hazard.Mater.* 219-220, 57-68.
- Zhang, L.R., Xing, D., 2008. Methyl jasmonate induced production of reactive oxygen species and alterations in mitochondrial dynamics that precede photosynthetic dysfunction and subsequent cell death. *Plant Cell. Physiol.* 49, 1092-1111.
- Zieske, L.R., 2006. A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J. Exp. Bot.* 57, 1501-1508.
- Zuo, Z.J., Zhu, Y.R., Bai, Y.L., Wang, Y., 2012. Acetic acid-induced programmed cell death and release of volatile organic compounds in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol. Biochem.* 51, 175-184.
- Zuppini, A., Andreoli, C., Baldan, B., 2007. Heat stress: an inducer of programmed cell death in *Chlorella saccharophila*. *Plant and Cell Physiol.* 48, 1000-1009.
- Zuppini, A., Bugno, V., Baldan, B., 2006. Monitoring programmed cell death triggered by mild heat shock in soybean-cultured cells. *Funct. Plant Biol.* 33, 617-627.
- Zuppini, A., Gerotto, C., Baldan, B., 2010. Programmed cell death and adaptation: two different types of abiotic stress response in a unicellular chlorophyte. *Plant Cell Physiol.* 51, 884-895.
- Zuppini, A., Gerotto, C., Moscatiello, R., Bergantino, E., Baldan, B., 2009. *Chlorella saccharophila* cytochrome f and its involvement in the heat shock response. *J. Exp. Bot.* 60, 4189-4200.

9. Anexos

Toxicidad ejercida por
contaminantes acuáticos sobre
microalgas de agua dulce



9.1. Anexo I. Material suplementario transcriptómica

9.1.1. Genes diferencialmente expresados a las 3 h con respecto a los cultivos control (Trancriptómica 3 h)

Categories	Gene ID	Gene name	Description	Biological Process/Molecular function	Process, group, domain	Log Fold Change	FDR
Unknown	205996	<i>LCID</i>	Limiting CO2 inducible protein	Limiting CO2 inducible protein	-	2.27	1.97e-07
Unknown	161422	<i>PMP1</i>	Low-CO2-inducible protein	LciB; Low-CO2-inducible protein	-	2.04	4.13e-24
Unknown	135713	<i>LCIC</i>	Low-CO2 inducible protein	Low-CO2 inducible protein,	-	1.48	5.78e-12
Unknown	177375	<i>MOT22</i>	Predicted protein	Predicted protein	-	1.34	0.00158
Unknown	81583	<i>LCI11</i>	Low-CO2-inducible membrane protein	Low-CO2-inducible membrane protein	-	1.31	1.3e-10
Unknown	195337	<i>FAP242</i>	Flagellar associated protein	Flagellar associated protein	-	1.29	6.52e-06
Unknown	189142	<i>LCI31</i>	Low-CO2-inducible protein	Low-CO2-inducible protein	-	1.20	3.28e-06
Unknown	115272	<i>NSG1</i>	Predicted protein	Predicted protein	-	-2.41	4.84e-12
Unknown	205921	<i>TPR2</i>	Predicted protein	Protein binding	-	-1.26	0.000501
Unknown	182392	<i>182392P</i>	Predicted protein	Predicted protein	-	-1.10	0.000184
Other	161525	<i>LYR1</i>	LYR protein	Protein targeting to mitochondrion, transport, protein targeting, mitochondrion organization	-	1.46	7.78e-06
Other	116762	<i>CGL48</i>	Lysine decarboxylase-like protein	Metabolic process	-	1.45	6.5e-06
Other	190282	<i>CGL52</i>	Predicted protein	Chloroplast relocation, photosynthesis, carotenoid biosynthetic process, thylakoid membrane organization, glucosinolate metabolic process, lipid metabolic process, carbohydrate metabolic process	-	1.43	2.99e-11
Other	206212	<i>NED1</i>	NAD dependent epimerase/dehydratase family protein	Cellular metabolic process	-	1.25	0.0034
Other	183344	<i>LCI15</i>	PRLI-interacting factor L	Protein binding	-	1.12	3.85e-06
Other	185334	<i>MTA3</i>	A3 protein	A3 protein, integral component of membrane	-	1.08	7.99e-07
Other	195435	<i>DRP4A</i>	Dynamamin-related GTPase	GTP catabolic process, cellular nitrogen compound metabolic process, nucleobase-containing compound	-	1.07	0.00196
Other	196812	<i>KIR1</i>	Ketoacid isomerase-like protein	Isomerase activity	-	-1.77	3.28e-06
Other	17088	<i>ELG9</i>	Exostosin-like glycosyltransferase	Transferase activity,	-	-1.69	1.78e-08
Other	193756	<i>YCF39-1</i>	Pyridine nucleotide binding protein	Myo-inositol hexakisphosphate biosynthetic process	-	-1.61	1.3e-07
Other	120386	<i>CGL7</i>	predicted protein	Integral component of membrane	-	-1.53	0.00526

Other	143148	<i>ERM9</i>	ERD4-related membrane protein	ERD4-related membrane protein	-	-1.49	4.44e-05
Other	144509	<i>ELG8</i>	Exostosin-like glycosyltransferase	Transferase activity	-	-1.43	6.85e-06
Other	180471	<i>ELG18</i>	Exostosin-like glycosyltransferase	Protein binding, transferase activity	-	-1.40	0.0008
Other	111778	<i>SNE5</i>	NAD-dependent epimerase/dehydratase	Nucleotide-sugar metabolic process, cellular metabolic process	-	-1.39	2.27e-09
Other	144608	<i>ELG2</i>	Exostosin-like glycosyltransferase	Response to stress	-	-1.35	0.000845
Other	196248	<i>SSD3</i>	Sterol sensing domain protein	Integral component of membrane	-	-1.34	0.00446
Other	15979	<i>ERM5</i>	ERD4-related membrane protein	Cellular_component	-	-1.30	1.8e-06
Other	33507	<i>ELG29</i>	Exostosin-like glycosyltransferase	Transferase activity	-	-1.15	7.97e-05
Other	196235	<i>CAM2B</i>	predicted protein	Calcio ion binding	-	-1.12	0.00575
Other	190979	<i>OAT1</i>	O-acetyltransferase-related protein	Transferase activity	-	-1.08	1.2e-05
Other	8449	<i>ELG15</i>	Exostosin-like glycosyltransferase	Protein binding, transferase activity	-	-1.05	9.51e-05
Other	205904	<i>CGL42</i>	Predicted protein	Photosynthesis, generation of precursor metabolites and energy, regulation of protein dephosphorylation	-	-1.03	0.000111
Other	180472	<i>ELG19</i>	Exostosin-like glycosyltransferase	Protein binding, transferase activity	-	-1.02	0.000598
Other	151355	<i>PRL5</i>	Predicted extracellular protein	Extracellular region	-	-1.01	0.000598
Metabolism	169412	<i>HPT1</i>	Hexose-phosphate transporter	Transmembrane transport	Transport	1.99	2.06e-09
Metabolism	179342	<i>CAV4</i>	Voltage-gated Ca ²⁺ channel, alpha subunit	Ion transport, transmembrane transport	Transport	1.63	7.38e-09
Metabolism	24240	<i>RHP-2</i>	Rh protein	Ammonium transport	Transport	1.58	1.06e-10
Metabolism	157754	<i>AMT1B</i>	Ammonium transporter	Ammonium transmembrane transport,	Transport	1.47	2.29e-12
Metabolism	128766	<i>LIP-36G2</i>	Envelope protein; Low-CO ₂ -inducible chloroplast envelope protein	Transport	Transport	1.42	2.38e-06
Metabolism	195467	<i>VMPL2</i>	R-SNARE protein, VAMP-like family, Synaptobrevin	Vesicle-mediated transport	Vesicular transport	1.37	0.00225
Metabolism	188977	<i>MITC11</i>	Mitochondrial carrier protein	Transport, mitochondrial transport, ornithine transport	Mitochondrial carrier	1.22	0.00451
Metabolism	189430	<i>CCP1</i>	Low-CO ₂ -inducible chloroplast envelope protein	Transport	Mitochondrial carrier	1.20	0.00175
Metabolism	196438	<i>PTB5</i>	Sodium/phosphate symporter	Phosphate ion transport	Transport	1.03	6.56e-06
Metabolism	196479	<i>DUR3A</i>	Urea active transporter, isoform A	Transport, transmembrane transport	Transport	-2.01	7.23e-11
Metabolism	196482	<i>DUR2</i>	Allophanate hydrolase	Allophanate hydrolase activity, carbon-nitrogen ligase activity, with glutamine as amido-N-donor, ligase activity	Secondary metabolites	-1.93	3.34e-05
Metabolism	116945	<i>COT1</i>	Cobalt transport protein	Maltose metabolic process, carbohydrate metabolic process, starch biosynthetic process, positive regulation of catalytic activity	Transport	-1.72	0.000112
Metabolism	195432	<i>DRP4B</i>	Dynamamin-related GTPase	GTP catabolic process, cellular nitrogen compound metabolic process, nucleobase-containing compound	Vesicular transport	-1.57	0.000574

Metabolism	81856	<i>THB1</i>	Predicted protein; Putative truncated hemoglobin	Oxygen transport	Transport	-1.47	1.57e-05
Metabolism	173281	<i>FEA2</i>	Fe-assimilating protein 2, High-CO2 and iron-deficiency-inducible periplasmic protein	Fe-assimilating protein 2	Transport	-1.36	2.49e-07
Metabolism	180411	<i>KUP5</i>	Potassium ion uptake transporter	Potassium ion uptake transporter	Transport	-1.35	0.00927
Metabolism	118745	<i>ARP3</i>	Actin-related protein	Actin filament organization, Arp2/3 complex-mediated actin nucleation, cytoskeleton organization, growth	Cytoskeleton	-1.29	0.00115
Metabolism	174212	<i>ZIP4</i>	ZIP family transporter	Metal ion transport, transmembrane transport	Transport	-1.27	0.00127
Metabolism	188195	<i>TUE</i>	Epsilon tubulin	GTP catabolic process, cellular nitrogen compound metabolic process, nucleobase-containing compound, microtubule-based process, protein polymerization, macromolecular complex assembly, centrosome organization, cytoskeleton organization	Cytoskeleton	-1.26	4.36e-05
Metabolism	129199	<i>NAR1</i>	Formate/nitrite transporter	Transport	Transport	-1.20	2.44e-05
Metabolism	192088	<i>NAR4</i>	High affinity nitrate transporter	Nitrate transport, nitrite transport, transmembrane transport	Transport	-1.16	1.04e-05
Metabolism	195469	<i>SEC1</i>	SM/Sec1-family protein	Vesicle docking involved in exocytosis, vesicle-mediated transport,	Vesicular transport	-1.11	2.2e-05
Metabolism	141439	<i>COG7</i>	Component of oligomeric golgi complex 7	Intracellular protein transport, Golgi organization, cell growth, protein retention in Golgi apparatus	Transport	-1.09	0.000351
Metabolism	195470	<i>VPS33</i>	SM/Sec1-family protein	Protein targeting to vacuole, vacuolar transport, vesicle docking involved in exocytosis, Golgi organization, vacuole organization, protein secretion, vesicle-mediated transport, Golgi vesicle transport	Vesicular transport	-1.09	0.00198
Metabolism	131436	<i>SLY1</i>	SM/Sec1-family protein	Vesicle docking involved in exocytosis, vesicle-mediated transport	Vesicular transport	-1.05	1.12e-05
Metabolism	24114	<i>ARP2</i>	Actin-related protein	Actin filament organization, Arp2/3 complex-mediated actin nucleation, cytoskeleton organization, growth	Cytoskeleton	-1.03	0.000371
Metabolism	130417	<i>GMP1</i>	GDP-D-mannose pyrophosphorylase	Biosynthetic process	Secondary metabolites	-1.02	1.12e-06
Cell cycle	103830	<i>ALK5</i>	Aurora-like kinase	Protein phosphorylation, cellular protein modification process	Cell cycle regulation	2.11	2.07e-05
Cell cycle	127391	<i>MCM7</i>	Minichromosome maintenance protein 7	Cellular nitrogen compound metabolic process, DNA replication, DNA methylation, chromatin silencing, transcription, DNA-templated, cell cycle, cellular protein modification process, chromosome organization, signal transduction, cell proliferation, biosynthetic process	DNA-replication and -biosynthesis	-2.80	7.15e-12
Cell cycle	152683	<i>MCM2</i>	Minichromosome maintenance protein 2	Cytokinesis by cell plate formation, cell division, cell cycle, acetyl-CoA metabolic process, sulfur compound metabolic process, cofactor metabolic process, DNA replication, cellular nitrogen compound metabolic process, DNA metabolic process, regulation of DNA replication, DNA methylation, cell proliferation, nucleotide biosynthetic process, histone lysine methylation, regulation of cell cycle	DNA-replication and -biosynthesis	-2.44	1.16e-09
Cell cycle	189721	<i>POLD1</i>	DNA polymerase	Double-strand break repair via homologous recombination, response to stress, cell division, cell cycle, DNA replication base-excision repair, gap-filling, synapsis, chromosome organization,	DNA-replication and -biosynthesis	-2.18	6.73e-07

Cell cycle	137896	<i>RFC3</i>	DNA replication factor C complex subunit 3	DNA replication, DNA metabolic process, cellular nitrogen compound metabolic process, biosynthetic process	DNA-replication and -biosynthesis	-2.12	1e-10
Cell cycle	130834	<i>FEN1</i>	Flap endonuclease 1	DNA replication, DNA metabolic process, DNA repair, response to stress, cellular response to DNA damage stimulus, nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis	DNA-replication and -biosynthesis	-2.09	5.68e-07
Cell cycle	133143	<i>LIG1</i>	DNA ligase	DNA replication, response to stress, DNA repair, nucleotide-excision repair, cellular response to DNA damage stimulus, DNA biosynthetic process	DNA-replication and -biosynthesis	-1.98	1.94e-07
Cell cycle	150793	<i>RFC1</i>	DNA replication factor C complex subunit 1	Cell division, cell cycle, DNA replication, response to stress, DNA repair, cellular response to DNA damage stimulus, regulation of chromatin silencing, DNA recombination	DNA-replication and -biosynthesis	-1.85	1.74e-07
Cell cycle	519	<i>RFC5</i>	DNA replication factor C complex subunit 5	mRNA processing, ATP catabolic process, DNA replication, mitotic recombination, chromosome organization, response to stress,	DNA-replication and -biosynthesis	-1.84	1.82e-09
Cell cycle	108650	<i>MAPK4</i>	Mitogen-activated protein kinase	MAPK cascade, signal transduction, protein phosphorylation, cellular protein modification process	Cell cycle regulation	-1.59	6.13e-05
Cell cycle	142882	<i>SMC3</i>	Structural maintenance of chromosomes protein 3	DNA repair, cellular nitrogen compound metabolic process, response to stress, cellular response to DNA damage stimulus, cell cycle, chromosome segregation, chromosome organization, mitotic nuclear division, production of ta-siRNAs involved in RNA interference,	DNA-replication and -biosynthesis	-1.58	3.51e-06
Cell cycle	35396	<i>CDH1</i>	Activator and specificity factor for anaphase promoting complex	Protein binding	Cell cycle regulation	-1.54	0.000514
Cell cycle	148151	<i>SEP1</i>	Septin-like protein	Cell cycle, small GTPase mediated signal transduction,	Cell division	-1.48	4.55e-12
Cell cycle	123286	<i>MRE11</i>	MRE11 eukaryotic DNA repair protein	DNA metabolic process, DNA repair, cellular response to DNA damage stimulus, response to stress, meiotic nuclear division, nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis, cellular nitrogen compound metabolic process, cell cycle	DNA-replication and -biosynthesis	-1.42	0.00256
Cell cycle	205630	<i>CGL35</i>	predicted protein	DNA-dependent DNA replication, DNA repair, response to stress	DNA-replication and -biosynthesis	-1.41	0.00593
Cell cycle	206149	<i>ATM1,ATM1-202</i>	DNA damage signaling kinase, ATM/TEL1-related	DNA damage checkpoint, telomere maintenance, cell cycle, chromosome organization, response to stress, DNA repair, histone phosphorylation, response to ionizing radiation, cellular response to DNA damage stimulus, replicative senescence	Cell cycle regulation	-1.36	0.0059
Cell cycle	195837	<i>RFC4</i>	DNA replication factor C complex subunit 4;	RNA methylation, cellular nitrogen compound metabolic process, ATP catabolic process, nucleobase-containing compound, DNA replication, pyrimidine ribonucleotide biosynthetic process, histone modification, chromosome organization	DNA-replication and -biosynthesis	-1.30	6.57e-06
Cell cycle	178882	<i>SMC1</i>	Structural maintenance of chromosomes protein 1	DNA repair, cellular nitrogen compound metabolic process, response to stress, cellular response to DNA damage stimulus, cell cycle, chromosome segregation, chromosome organization, mitotic nuclear division, production of ta-siRNAs involved in RNA interference,	DNA-replication and -biosynthesis	-1.27	0.00602
Cell cycle	140580	<i>PCN1</i>	PCNA proliferating cell nuclear antigen	DNA replication, cellular nitrogen compound metabolic process, regulation of DNA replication	DNA-replication and -biosynthesis	-1.16	1.12e-06
Cell cycle	142479	<i>MSH1</i>	DNA mismatch repair MutS protein	Meiotic mismatch repair, cell division, response to stress,	Cell division	-1.14	0.000374

				chromosome organization, maintenance of DNA repeat elements			
Cell cycle	185583	<i>RIR1</i>	Ribonucleoside-diphosphate reductase	Gluconeogenesis, carbohydrate metabolic process, DNA replication, cellular nitrogen compound metabolic process, cytoskeleton organization, nucleotide biosynthetic process, deoxyribonucleoside triphosphate biosynthetic process, proteasomal protein catabolic process, oxidation-reduction process	DNA-replication and -biosynthesis	-1.13	0.000333
Gene expression	196585	<i>RHE</i>	RNA helicase	RNA methylation, cellular nitrogen compound metabolic process, protein maturation	RNA-processing	1.85	1e-11
Gene expression	144221	<i>CGL28</i>	RNA binding protein, RRM (RNA recognition motif) containing protein	Nucleotide binding	RNA-binding, processing	1.78	2.53e-09
Gene expression	141857	<i>MAPKKK11</i>	Mitogen activated protein kinase kinase 11	Protein phosphorylation, cellular protein modification process,	Post-translational modification	1.77	3.73e-05
Gene expression	189052	<i>LCI26</i>	Low-CO2-induced U-box protein	Protein ubiquitination, cellular protein modification process	Post-translational modification	1.16	0.000552
Gene expression	142698	<i>FKB16-1</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Histone peptidyl-prolyl isomerization, cellular protein modification process, chromosome organization, protein folding, peptidyl-proline modification	Protein folding	1.12	2.25e-06
Gene expression	190458	<i>RPOD</i>	Chloroplast RNA polymerase sigma factor	DNA-templated transcription, initiation, regulation of transcription, DNA-templated	Transcription	1.09	2.98e-08
Gene expression	31077	<i>DNJ34</i>	DnaJ-like protein, DnaJ domain containing protein	Protein folding, heat shock proteins, co-chaperone	Protein folding	1.07	1.97e-07
Gene expression	128965	<i>DHS1</i>	Deoxypusine synthase 1	Peptidyl-lysine modification to peptidyl-hypusine, cellular protein modification process	Post-translational modification	1.02	0.00137
Gene expression	139610	<i>GBA1</i>	GTP binding protein TypA, putative translation elongation factor	Response to reactive oxygen species, response to stress, GTP catabolic process, translation, regulation of gene expression, chloroplast RNA processing, cellular nitrogen compound metabolic	Ribosomes and translation	1.00	8.56e-07
Gene expression	97057	<i>HSP90B</i>	Heat shock protein 90B	Gluconeogenesis, carbohydrate metabolic process, glycolytic process, generation of precursor metabolites and energy protein folding, response to stress, Golgi organization	Protein folding, heat shock proteins	-1.42	1.52e-09
Gene expression	191024	<i>NUP155</i>	Nuclear pore protein	RNA methylation, cellular nitrogen compound metabolic process, nucleocytoplasmic transport	RNA-processing	-1.41	1.12e-05
Gene expression	169416	<i>EFTS</i>	Elongation factor Ts, mitochondrial	Translation, translational elongation	Ribosomes and translation	-1.40	4.66e-05
Gene expression	17391	<i>ABH1</i>	mRNA cap-binding protein	Microtubule cytoskeleton organization, RNA splicing, via endonucleolytic cleavage and ligation, mRNA splicing, via spliceosome, DNA methylation, chromatin silencing, transcription from RNA polymerase II promoter, 7-methylguanosine mRNA capping, mRNA processing, translation, RNA splicing, methionine biosynthetic process, RNA metabolic process, protein ubiquitination, gene silencing by RNA, lipid storage, mRNA transport, histone H3-K9 methylation, chromosome organization	RNA-processing	-1.40	0.00355
Gene expression	12013	<i>DCL3</i>	Dicer-like protein	RNA processing, cellular nitrogen compound metabolic process, rRNA catabolic process	RNA-processing	-1.38	9.02e-07

Gene expression	15589	<i>HSP70E</i>	Heat shock protein 70E	response to stress	Protein folding, heat shock proteins	-1.36	1.21e-06
Gene expression	106481	<i>EFG7</i>	Elongation factor-like protein	GTP catabolic process, cellular nitrogen compound metabolic process, nucleobase-containing compound, translational elongation, protein targeting to mitochondrion	Ribosomes and translation	-1.34	0.000983
Gene expression	115081	<i>CPN60C</i>	Chaperonin 60C	Protein folding, cellular protein metabolic process	Protein folding	-1.28	1.11e-08
Gene expression	133000	<i>DUR1</i>	Urea carboxylase	Protein peptidyl-prolyl isomerization, protein folding, metabolic process	Protein folding	-1.24	0.00201
Gene expression	146892	<i>TIM22C</i>	Mitochondrial inner membrane translocase	Membrane, integral component of membrane	Protein targeting, mitochondria	-1.23	0.00101
Gene expression	21717	<i>SET4</i>	Histone methyltransferase	Methylation	Chromatin structure	-1.20	0.000275
Gene expression	182328	<i>CYN51</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type	Protein peptidyl-prolyl isomerization, cellular protein modification process, protein folding	Protein folding	-1.11	1.07e-07
Gene expression	143037	<i>FKB16-9</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Protein peptidyl-prolyl isomerization, cellular protein modification process, protein folding, peptidyl-proline modification	Protein folding	-1.11	0.000445
Gene expression	156074	<i>FKB18</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Protein peptidyl-prolyl isomerization, protein folding, cellular protein modification process	Protein folding	-1.08	0.000114
Gene expression	132633	<i>MGE1</i>	Mitochondrial grpE-type co-chaperone of the HSP70 system	Protein folding	Protein folding	-1.07	0.000259
Gene expression	195849	<i>SRP35</i>	SR protein factor	Nucleotide binding, nucleic acid binding	Ribosomes and translation	-1.05	2.43e-06
Gene expression	135470	<i>PRP38</i>	Pre-mRNA splicing factor	Pre-mRNA splicing factor	RNA-processing	-1.05	0.00469
Photosynthesis	135648	<i>LCIA</i>	Low-CO2-inducible membrane protein	Low-CO2-inducible membrane protein	-	1.82	1.48e-10
Photosynthesis	148916	<i>ELI3</i>	Early light inducible chlorophyll a/b binding protein	Early light-inducible protein, Chlorophyll binding	Chlorophyll binding	1.40	0.000105
Photosynthesis	134058	<i>HLA3</i>	ABC transporter, multidrug-resistance-related proteins (MRP) subfamily	ATP catabolic process, cellular nitrogen compound metabolic process, nucleobase-containing compound, transmembrane transport	CCM	1.21	0.00172
Photosynthesis	184730	<i>LHCSR3</i>	Stress-related chlorophyll a/b binding protein 3	Photosynthesis	Chlorophyll binding	-2.70	4.36e-43
Photosynthesis	184731	<i>LHCSR3</i>	Stress-related chlorophyll a/b binding protein 3	Photosynthesis	Chlorophyll binding	-2.23	1.36e-31
Photosynthesis	184724	<i>LI818R-1</i>	LI818r-1 protein; Stress-related chlorophyll a/b binding protein 1	Generation of precursor metabolites and energy, photosynthesis	Chlorophyll binding	-1.64	5.53e-12
Photosynthesis	205757	<i>PTOX2</i>	Alternative oxidase, Plastid terminal oxidase 2	Oxidation-reduction process, Photosynthetic electron transport	Photosynthetic electron transport	-1.37	1.92e-07
Photosynthesis	205752	<i>LHCBM8</i>	Chlorophyll a-b binding protein of LHCII	Photosynthesis, light harvesting, generation of precursor metabolites and energy	Light harvesting, PSII	-1.05	0.000119
Photosynthesis	24552	<i>CAH4</i>	Mitochondrial carbonic anhydrase, beta type	Carbonate dehydratase activity, lyase activity, zinc ion binding	Carbon concentrating mechanism (CCM)	-1.03	2.25e-05
Photosynthesis	196876	<i>CAH5</i>	Mitochondrial carbonic anhydrase	Carbonate dehydratase activity, lyase activity, zinc ion binding	CCM	-1.00	0.000493

Energy	196831	<i>MME4</i>	Malic enzyme	Malate metabolic process, oxidation-reduction process	Glycolysis/gluconeogenesis	1.38	0.00195
Energy	180281	<i>ETFB</i>	Electron transfer flavoprotein beta subunit	Respiratory electron transport, leucine catabolic process, cellular amino acid metabolic process, chlorophyll catabolic process, cellular nitrogen compound metabolic process, methylglyoxal catabolic process to D-lactate, oxidation-reduction process	Respiratory electron transport	1.27	0.000752
Energy	191668	<i>ICL1</i>	Isocitrate lyase	Carbohydrate metabolic process, glyoxylate cycle, tricarboxylic acid cycle, generation of precursor metabolites and energy	Glycolysis/gluconeogenesis	1.26	9.73e-07
Energy	196612	<i>PCK1B</i>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, splice variant	Gluconeogenesis, carbohydrate metabolic process, phosphorylation	Glycolysis/gluconeogenesis	1.13	0.000124
Energy	189344	<i>ETFA</i>	Electron transfer flavoprotein alpha subunit	Oxidation-reduction process, Respiratory electron transport	Respiratory electron transport	1.11	0.000147
Energy	196311	<i>ACS3</i>	Acetyl CoA synthetase	Metabolic process, acetyl-CoA biosynthetic process from acetate, sulfur compound metabolic process, cofactor metabolic process	Acetate uptake/activation	1.06	1.7e-07
Energy	196328	<i>MS1</i>	Malate synthase	Carbohydrate metabolic process, glyoxylate cycle, tricarboxylic acid cycle, generation of precursor metabolites and energy	Glycolysis/gluconeogenesis	1.04	1.94e-05
Energy	147722	<i>MME2</i>	Malic enzyme	Malate metabolic process, oxidation-reduction process	Glycolysis/gluconeogenesis	1.01	1.01e-06
Energy	140618	<i>GAP1A</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycolysis/gluconeogenesis, cytosolic, glucose metabolic process, carbohydrate metabolic process, glycolytic process, generation of precursor metabolites and energy, oxidation-reduction process	Glycolysis/gluconeogenesis	-1.92	3.27e-11
Energy	152708	<i>PHOA</i>	Starch phosphorylase	Carbohydrate metabolic process	Starch	-1.91	7.88e-21
Energy	173841	<i>GLD2-N</i>	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Carbohydrate metabolic process, glucose metabolic process, pentose-phosphate shunt, oxidation-reduction process, cofactor metabolic process, catabolic process, cellular nitrogen compound metabolic process	Pentose phosphate pathway, oxidative	-1.80	1.3e-10
Energy	30383	<i>PGM3</i>	Histidine phosphatase superfamily/phosphoglycerate mutase family protein	Glycolysis/gluconeogenesis, metabolic process	Glycolysis/gluconeogenesis	-1.69	0.000173
Energy	116873	<i>AGA1</i>	Alpha-galactosidase	Carbohydrate metabolic process, oligosaccharide metabolic process, glycoside catabolic process, glycosylceramide catabolic process	Glycolysis/gluconeogenesis	-1.59	3.15e-07
Energy	58178	<i>AMYA2</i>	Alpha-amylase	Starch, carbohydrate metabolic process, circadian rhythm	Starch	-1.50	3.95e-11
Energy	137300	<i>PHOB</i>	Phosphorylase	Carbohydrate metabolic process	Starch	-1.46	2.9e-12
Energy	192597	<i>GND1A</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	Pentose-phosphate shunt, carbohydrate metabolic process, cofactor metabolic process, oxidation-reduction process	Pentose phosphate pathway, oxidative	-1.44	9.77e-09
Energy	21582	<i>HXK1</i>	Hexokinase	Carbohydrate metabolic process, glycolytic process, generation of precursor metabolites and energy, phosphorylation	Glycolysis/gluconeogenesis	-1.39	2.46e-05
Energy	118976	<i>SBE1</i>	Starch branching enzyme	Carbohydrate metabolic process, glycogen biosynthetic process, generation of precursor metabolites and energy	Starch	-1.31	1.11e-08
Energy	146575	<i>GLK1</i>	Glucokinase	Glycolytic process, carbohydrate metabolic process, generation of precursor metabolites and energy, catabolic process, phosphorylation, glucose 6-phosphate metabolic process,	Glycolysis/gluconeogenesis	-1.26	1.96e-07

				Glycolysis/gluconeogenesis			
Energy	139260	<i>SNE6</i>	UDP-glucose 4-epimerase	Galactose metabolic process, carbohydrate metabolic process, cellular metabolic process	Glycolysis/gluconeogenesis	-1.15	4.14e-07
Energy	127786	<i>PDC3</i>	Mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex, E1 component, alpha subunit	Metabolic process	Glycolysis/gluconeogenesis	-1.10	2.56e-07
Energy	196430	<i>PFK2</i>	Phosphofructokinase family protein	Fructose 6-phosphate metabolic process, glycolytic process, carbohydrate metabolic process, generation of precursor metabolites and energy, phosphorylation	Glycolysis/gluconeogenesis	-1.09	2.83e-07
Energy	205622	<i>SSS1</i>	Soluble starch synthase	Biosynthetic process, glucan biosynthetic process, carbohydrate metabolic process	Starch	-1.08	6.63e-07
Energy	146213	<i>GPM2</i>	phosphoglucomutase activity	Carbohydrate metabolic process	Glycolysis/gluconeogenesis	-1.07	0.00531
Energy	196351	<i>MME5</i>	Malic enzyme	Malate metabolic process, oxidation-reduction process	Glycolysis/gluconeogenesis	-1.05	0.000665
Amino acids	205945	<i>AAH1</i>	Aromatic amino acid hydroxylase-related protein	Amino acid catabolism, Phe, aromatic amino acid family metabolic process; Chloroplast phenylalanine hydroxylase	Amino acid catabolism, Phe	2.23	9.51e-25
Amino acids	193008	<i>MCCA</i>	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase alpha subunit	Amino acid catabolism, Leu, cellular amino acid metabolic process; catabolic process; small molecule metabolic process; response to fructose	Amino acid catabolism, Leu	1.98	3.21e-13
Amino acids	82916	<i>GDH2</i>	Glutamate dehydrogenase	Amino acid catabolism, Glu, cellular amino acid metabolic process, oxidation-reduction process	Amino acid catabolism, Glu	1.86	1.12e-11
Amino acids	205967	<i>AGT3</i>	Alanine-glyoxylate aminotransferase	Metabolic process, Amino acid catabolism, Ala / amino acid anabolism, Gly	Amino acid catabolism, Ala / amino acid anabolism, Gly	1.32	7.93e-05
Amino acids	194609	<i>SGA1A</i>	Serine glyoxylate aminotransferase	Metabolic process, response to stress, divalent metal ion transport, homeostatic process	Amino acid catabolism/anabolism, Ser, Gly, Thr	1.12	1e-07
Amino acids	186295	<i>CLR21</i>	Predicted protein of CLR family	Catalytic activity, Pyridoxal phosphate binding	Amino acid catabolism, Met (?)	1.09	0.00149
Amino acids	137761	<i>HPPD1</i>	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Aromatic amino acid family metabolic process, oxidation-reduction process	Amino acid catabolism, Tyr	1.04	2.11e-07
Amino acids	205746	<i>GSN1</i>	Glutamate synthase	Amino acid biosynthesis, Glu, NADH-dependent; biosynthetic process; carbohydrate metabolic process; generation of precursor metabolites and energy; cellular amino acid metabolic process; biosynthetic process; nitrogen cycle metabolic process; growth; small molecule metabolic process; response to stress	Amino acid biosynthesis, Glu	-2.13	4.88e-17
Amino acids	189050	<i>PROB1</i>	Glutamate 5-kinase	Proline biosynthetic process, cellular amino acid metabolic process, phosphorylation	Amino acid biosynthesis, Pro	-1.97	8.42e-09
Amino acids	154307	<i>METE</i>	Cobalamin-independent methionine synthase	Amino acid biosynthesis, Me, cellular amino acid biosynthetic process, methionine biosynthetic process, sulfur compound metabolic process, methylation	Amino acid biosynthesis, Met	-1.40	9.14e-05
Lipids	205924	<i>CGLD15</i>	Triacylglycerol lipase-like protein	Lipid metabolic process	TAG-lipase	1.23	2.48e-07

Lipids	185186	<i>BKT</i>	Beta-carotene ketolase; Putative chloroplast carotene beta ketolase	Lipid metabolic process	Lipid metabolic process	1.02	7.09e-06
Lipids	135825	<i>FAD2</i>	Fatty acid desaturase, delta-12	Microsomal delta-12 fatty acid desaturase, lipid metabolic process; small molecule metabolic process, oxidation-reduction process	FA-desaturase	-1.57	9.17e-13
Lipids	119132	<i>CPLD27</i>	Coclaurine N-methyltransferase	Lipid biosynthetic process, methylation	Lipid biosynthetic process	-1.56	2.3e-11
Lipids	116277	<i>SQD2</i>	Sulfolipid synthase	Unsaturated fatty acid biosynthetic process, lipid metabolic process, glycolipid biosynthetic process, chlorophyll biosynthetic process, cellular nitrogen compound metabolic process, cellular response to phosphate starvation, response to stress, carotenoid biosynthetic process, isopentenyl diphosphate biosynthetic process, methylerythritol 4-phosphate pathway, galactolipid biosynthetic process, glucosinolate biosynthetic process, sulfolipid biosynthetic process	Membrane lipid biosynthesis/remodeling	-1.13	4.61e-05
Lipids	77062	<i>BTA1</i>	Betaine lipid synthase; Diacylglycerol-N,N,N-trimethylhomoserine synthesis protein	Betaine lipid synthase; Diacylglycerol-N,N,N-trimethylhomoserine synthesis protein	Membrane lipid biosynthesis/remodeling	-1.11	2.46e-07
Lipids	79396	<i>EPT</i>	CDP-Ethanolamine:DAG ethanolamine phosphotransferase; Ethanolaminephosphotransferase	CDP-choline pathway, cellular nitrogen compound metabolic process, lipid metabolic process, phospholipid biosynthetic process,	Membrane lipid biosynthesis/remodeling	-1.02	0.000249
Regulation	167324	<i>CYG1</i>	Guanylate cyclase	Sensing and signaling, cyclic nucleotides, cGMP biosynthetic process, cellular nitrogen compound metabolic process, cyclic nucleotide biosynthetic process, intracellular signal transduction	Sensing and signaling, cyclic nucleotides	1.69	0.00161
Regulation	114905	<i>CYG54</i>	Guanylate cyclase	Sensing and signaling, cyclic nucleotides, cyclic nucleotide biosynthetic process, cellular nitrogen compound metabolic process, intracellular signal transduction	Sensing and signaling, cyclic nucleotides	1.45	8.43e-05
Regulation	195498	<i>OEP80</i>	Chloroplast outer envelope protein	Phosphoprotein phosphatase activity, hydrolase activity, phosphatase activity	Protein phosphatase	-1.12	0.000283
Regulation	147241	<i>KDG2</i>	Diacylglycerol kinase	Sensing and signaling, lipids, protein kinase C-activating G-protein coupled receptor signaling pathway, signal transduction, metabolic process, phosphorylation	Sensing and signaling, lipids	-1.10	0.000619
ROS and stress	192937	<i>GOX18</i>	Glyoxal or galactose oxidase	Glyoxal or galactose oxidase, ROS/RNS-production, peroxide	ROS/RNS-production, peroxide	1.67	0.000121
ROS and stress	196820	<i>GOX9</i>	Glyoxal or galactose oxidase	Glyoxal or galactose oxidase, ROS/RNS-production, peroxide	ROS/RNS-production, peroxide	1.33	9.28e-06
ROS and stress	178662	<i>AMX2</i>	Copper Amine oxidase	ROS/RNS-production, peroxide, amine metabolic process, oxidation-reduction process	ROS/RNS-production, peroxide,	1.05	9.23e-05
Redox	148253	<i>HCP1</i>	Hybrid-cluster protein	Oxidation-reduction process	Oxidoreductase	-1.65	0.000733
Redox	196719	<i>CYP747A1</i>	Cytochrome P450	Oxidation-reduction process	Cytochrome P450	-1.59	1.22e-08
Redox	150540	<i>PAO1</i>	Pheophorbide a oxygenase	Oxidation-reduction process	Oxidoreductase	-1.48	0.00327
Redox	184661	<i>NIT1</i>	Nitrate reductase	Nitrate assimilation, oxidation-reduction process, nitrogen cycle metabolic process	Oxidoreductase	-1.43	2.59e-07

Redox	196684	<i>CYP739A6</i>	Cytochrome P450	Oxidation-reduction process	Cytochrome P450	-1.37	0.000208
Redox	190083	<i>CAT2</i>	Catalase/peroxidase	Response to oxidative stress, oxidation-reduction process	Oxidoreductase	-1.34	5.64e-05
Redox	196685	<i>CYP740A1</i>	Cytochrome P450	Oxidation-reduction process	Cytochrome P450	-1.32	2.13e-05
Redox	148255	<i>HCP4</i>	Hybrid-cluster protein	Oxidation-reduction process	Oxidoreductase	-1.32	0.000411
Redox	196649	<i>MSD3</i>	Superoxide dismutase	Superoxide metabolic process, oxidation-reduction process	Oxidoreductase	-1.26	0.000322
Redox	158152	<i>EZY22</i>	NAD-dependent epimerase/dehydratase	Extracellular polysaccharide biosynthetic process, carbohydrate metabolic process	Oxidoreductase	-1.19	1.41e-07
Redox	192806	<i>CCPR1</i>	Cytochrome c peroxidase	Response to oxidative stress, oxidation-reduction process	Oxidoreductase	-1.14	8.37e-05
Redox	205498	<i>EZY12</i>	UDP-glucose 6-dehydrogenase	Oxidation-reduction process	Oxidoreductase	-1.12	1.32e-07
Redox	163751	<i>CBR1</i>	NADH-cytochrome b5 reductase	N-terminal protein myristoylation, cellular protein modification process, electron transport chain, generation of precursor metabolites and energy, D-xylose metabolic process, carbohydrate metabolic process, oxidation-reduction process	Oxidoreductase	-1.04	3.67e-05
Redox	134165	<i>GSHR1</i>	Glutathione reductase	Glutathione metabolic process, sulfur compound metabolic process, cellular nitrogen compound metabolic process, cellular amino acid metabolic process, toxin catabolic process, cell redox homeostasis, oxidation-reduction process	Oxidoreductase	-1.02	0.000532
Proteases	192029	<i>MMP13</i>	Matrix metalloproteinase-like protein	Matrix metalloproteinase-like protein	Protease	1.31	2.64e-09
Proteases	130038	<i>MMP3</i>	Matrix metalloproteinase	Proteolysis	Protease	1.05	2.59e-07
Proteases	205541	<i>FAP277</i>	Flagellar associated protein, protease inhibitor-like protein	Proteolysis, negative regulation of endopeptidase activity	Protease	-1.18	1.72e-06
Proteases	144136	<i>SPP1A</i>	Signal peptide peptidase	Signal peptide processing, cellular nitrogen compound metabolic process, protein maturation, proteolysis, response to stress	Protease	-1.15	0.00243

9.1.2. Genes diferencialmente expresados a las 24 h con respecto a los cultivos control (Trancriptómica 24 h)

Categories	Gene ID	Gene name	Description	Biological Process/Molecular function	Process, group, domain	Log Fold Change	FDR
Unknown	145947	<i>CGL16</i>	Predicted protein	-	-	1.85	0.00975
Unknown	153715	<i>FAP15</i>	Flagellar associated protein	-	-	1.50	0.000357
Unknown	129929	<i>H43</i>	Fe-assimilating protein 1	High-CO2 inducible, periplasmic protein	-	-1.40	0.000142
Other	140923	<i>ARS3</i>	Arylsulfatase	Catalytic activity, sulfuric ester hydrolase activity	-	1.48	0.00168
Metabolism	24240	<i>RHP-2</i>	Rh protein	Ammonium transmembrane transport	Metabolite transport	1.42	5.72e-09
Metabolism	192090	<i>NAR3</i>	Predicted protein	Nitrate transmembrane transport	Metabolite transport	-1.31	2.26e-07
Gene expression	142698	<i>FKB16-1</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Histone peptidyl-prolyl isomerization, protein folding, peptidyl-proline modification. Localización: núcleo	Protein folding/Post-translational modification	1.05	0.000409
Gene expression	96566	<i>DNJ35</i>	DnaJ-like protein	Protein folding	Protein folding	-1.01	0.00198
Photosynthesis	191585	<i>ELI1</i>	Early light-inducible protein	Chlorophyll a/b binding protein. ¿Fotoprotector. Expresión temprana a altas intensidades de luz?	Chlorophyll binding	-1.31	0.000176
Energy	189344	<i>ETFA</i>	Electron transfer flavoprotein alpha subunit	Electron carrier activity. Localización: mitocondrial	Respiratory electron transport	1.66	2.51e-05
Energy	180281	<i>ETFB</i>	Electron transfer flavoprotein beta subunit	Chlorophyll catabolic process, leucine catabolic process. Localización: mitocondrial	Respiratory electron transport	1.61	0.000574
Energy	191668	<i>ICL1</i>	Isocitrate lyase	Glyoxylate cycle, tricarboxylic acid cycle. Localización: peroxisomas/glioxisomas.	TCA or glyoxylate cycle	1.31	0.00286
Energy	118171	<i>AMYA1</i>	Alpha-amylase	Carbohydrate catalytic activity	Starch	1.22	9.13e-06
Energy	196612	<i>PCK1B</i>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	Glycolysis/gluconeogenesis	Glycolysis/gluconeogenesis	1.08	0.000768
Amino acids	186295	<i>CLR21</i>	Predicted protein of CLR family	Catalytic activity. Pyridoxal phosphate binding.	Amino acid catabolism_Met	2.96	2.18e-06
Amino acids	205945	<i>AAH1</i>	Chloroplast phenylalanine hydroxylase	Aromatic amino acid family metabolic process. Monooxygenase activity, oxidoreductase activity.	Amino acid catabolism_Phe	1.76	9.44e-13
Amino acids	193008	<i>MCCA</i>	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase alpha subunit	Leucine catabolic process, response to sucrose and fructose	Amino acid catabolism_Leu	1.31	2.51e-05
Amino acids	82916	<i>GDH2</i>	Glutamate dehydrogenase	Cellular amino acid metabolic process	Amino acid catabolism_Glu	1.30	3.58e-07
Amino acids	192085	<i>NII1</i>	Nitrite reductase	Nitrate transport and assimilation, cysteine biosynthetic process.	Amino acid biosynthesis_Cys	-1.46	5.05e-08
Amino acids	170370	<i>PROB2</i>	Glutamate 5-kinase	Proline biosynthetic process. Localización: citosol.	Amino acid biosynthesis_Pro	-1.07	0.00282

ROS/RNS, stress	196820	<i>GOX9</i>	Glyoxal or galactose oxidase	ROS/RNS-production, peroxide	ROS/RNS-production, peroxide	1.41	0.000724
ROS/RNS, stress	187517	<i>CYG12</i>	Guanylate cyclase; Soluble guanylyl cyclase beta; Heme-NO binding guanylate cyclase	cGMP biosynthetic process, cyclic nucleotide biosynthetic process, intracellular signal transduction.	ROS/RNS-signaling	1.06	0.00782
Redox	156833	<i>FDX5</i>	Apoferrodoxin	Electron transport chain	Electron transport, soluble	-2.51	7.05e-13
Redox	173277	<i>TEF22</i>	Predicted protein	Cytochrome b-561 / ferric reductase transmembrane and DOMON domain containing protein	Electron transport, membrane	-1.82	0.00254
Redox	184661	<i>NIT1</i>	Nitrate reductase	Nitrate assimilation, oxidation-reduction process	Oxidoreductase	-1.43	3.53e-07

9.1.3. Genes diferencialmente expresados a las 96 h con respecto a los cultivos control (Trancriptómica 96 h)

Categories	Gene ID	Gene name	Description	Biological Process/Molecular function	Process, group, domain	Log Fold Change	FDR
Unknown	161422	<i>PMP1</i>	LciB; Low-CO ₂ -inducible protein	LciB; Low-CO ₂ -inducible protein	-	1.27	1.06e-07
Unknown	206193	<i>EZY7</i>	Predicted protein	Predicted protein	-	-1.46	1.2e-05
Unknown	155961	<i>CPO1</i>	Predicted protein	Location: chloroplast	-	-1.41	0.00107
Unknown	141254	<i>CPLD14</i>	Predicted protein	Predicted protein	-	-1.16	0.00791
Other	194159	<i>FAS2</i>	Fasciclin-like protein	Similar to periostin/fasciclin/TGFbeta-induced protein; contains 4 FAS1 (BlgH3) domains, involved in cell recognition; probably extracellular, GPI-anchored (by homology)	Extracellular, cell adhesion	1.77	1.28e-09
Other	205904	<i>CGL42</i>	Predicted protein	Photosynthesis, light reaction, generation of precursor metabolites and energy, regulation of protein dephosphorylation	-	-1.39	3.04e-05
Other	17088	<i>ELG9</i>	Exostosin-like glycosyltransferase	Protein binding, transferase activity	-	-1.86	7.15e-06
Other	132166	<i>AMI1</i>	Formamidase	Hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds, in linear amides	-	-1.82	1.14e-09
Other	15136	<i>ELG13</i>	Exostosin-like glycosyltransferase	Transferase activity, protein binding, belongs to the family of exostosin-like glycosyltransferases	-	-1.78	0.000204
Other	193756	<i>YCF39-1</i>	Pyridine nucleotide binding protein	Myo-inositol hexakisphosphate biosynthetic process, Extended short-chain dehydrogenase similar to the NAD-binding domain of Tic62-3	-	-1.71	0.000212
Other	190979	<i>OAT1</i>	O-acetyltransferase-related protein	Transferase activity, similar to O-acetyltransferase-related protein of <i>Arabidopsis thaliana</i> ; Genbank entry AY136339	-	-1.28	0.000114
Other	111778	<i>SNE5</i>	NAD-dependent epimerase/dehydratase	Nucleotide-sugar metabolic process, catalytic activity	-	-1.19	0.000401
Other	196952	<i>SNE1</i>	Sugar nucleotide epimerase	Nucleotide-sugar metabolic process, L-ascorbic acid biosynthetic process.	-	-1.13	0.000405
Other	144935	<i>ZYS3-2</i>	Zygote-specific protein	Protein binding	-	-1.01	0.000912
Metabolism	205765	<i>AOC5</i>	Cationic amino acid transporter or	Amino acid transmembrane transport	Transport	1.21	0.00633
Metabolism	183357	<i>PTA3</i>	Pi-transporter homologue A-3; Proton/phosphate symporter	Transmembrane transport,	Transport	1.18	0.000788
Metabolism	183171	<i>ZIP6</i>	ZIP family transporter	Metal ion transmembrane transport	Ion transport	1.12	0.000332
Metabolism	118745	<i>ARP3</i>	Actin-related protein	Cell morphogenesis, actin filament organization, multidimensional cell growth, regulation of actin filament polymerization. structural constituent of cytoskeleton.	Cytoskeleton	-1.52	0.00472
Metabolism	195690	<i>SEC24C</i>	COP-II coat subunit	Intracellular protein transport, ER to Golgi vesicle-mediated transport	Vesicular transport	-1.27	0.00246
Metabolism	188933	<i>TUBG</i>	Tubulin gamma chain	GTP catabolic process, microtubule-based process, microtubule nucleation, cytoplasmic microtubule organization, protein polymerization	Cytoskeleton	-1.26	0.0026

Metabolism	141439	COG7	Component of oligomeric golgi complex 7	Intracellular protein transport, Golgi organization, cell growth, protein retention in Golgi apparatus,	Transport	-1.18	0.00909
Metabolism	191834	COG2	Component of oligomeric golgi complex 2	Golgi organization, protein transport	Transport	-1.15	0.00931
Cell cycle	133143	LIG1	DNA ligase	DNA replication, cellular nitrogen compound metabolic process, DNA ligation, lagging strand elongation, DNA repair, nucleotide-excision repair, DNA recombination, cellular response to DNA damage stimulus, DNA ligation involved in DNA repair, response to stress, DNA biosynthetic process	DNA-replication and -biosynthesis	-2.05	7.15e-06
Cell cycle	137896	RFC3	DNA replication factor C complex subunit 3	DNA replication, DNA-dependent DNA replication, cellular nitrogen compound metabolic process, DNA metabolic process, nucleotide binding, nucleoside-triphosphatase activity, DNA binding	DNA-replication and -biosynthesis	-1.76	8.49e-05
Cell cycle	142479	MSH1	DNA mismatch repair MutS protein	Meiotic mismatch repair, reciprocal meiotic recombination, maintenance of DNA repeat elements	Cell division	-1.71	0.0026
Cell cycle	519	RFC5	DNA replication factor C complex subunit 5	mRNA splicing, via spliceosome, cellular nitrogen compound metabolic process, ATP catabolic process, DNA replication, mitotic recombination, methylation-dependent chromatin silencing, defense response, RNA interference, histone modification, chromatin silencing by small RNA, negative regulation of defense response, histone H3-K9 methylation, chromosome organization	DNA-replication and -biosynthesis	-1.58	0.000178
Cell cycle	195837	RFC4	DNA replication factor C complex subunit 4; RFC4p	RNA methylation, ATP catabolic process, DNA replication, cellular nitrogen compound metabolic process, nucleobase-containing compound, pyrimidine ribonucleotide biosynthetic process, histone modification, cellular protein modification process	DNA-replication and -biosynthesis	-1.49	0.00019
Cell cycle	142882	SMC3	Structural maintenance of chromosomes protein 3	DNA repair, cell cycle, chromosome segregation, sister chromatid cohesion, mitotic and meiotic nuclear division, production of ta-siRNAs involved in RNA interference, production of miRNAs involved in gene silencing by miRNA, defense response to virus.	Chromosome partition	-1.33	0.00027
Cell cycle	140580	PCN1	PCNA proliferating cell nuclear antigen	DNA replication, regulation of DNA replication, cellular nitrogen compound metabolic process	DNA-replication and -biosynthesis	-1.31	8.16e-05
Cell cycle	13480	RAD50	DNA repair protein	DNA repair, microtubule cytoskeleton organization, mitotic cell cycle, mitotic recombination, telomere maintenance, RNA processing, protein import into nucleus, cell-cell signaling,	-	-1.27	0.000538
Cell cycle	185418	RFC2	DNA replication factor C complex subunit 2	ATP catabolic process, cellular nitrogen compound metabolic process, nucleobase-containing compound, catabolic process, DNA replication	DNA-replication and -biosynthesis	-1.25	0.00018
Gene expression	36125	DNJ31	DnaJ-like protein	Chaperone	Protein folding	1.68	0.000442
Gene expression	144221	CGL28	RNA binding protein	Nucleotide binding, nucleic acid binding	RNA-binding	1.20	0.00122
Gene expression	144028	CGLD3	DEAD/DEAH-box DNA/RNA helicase	DEAD/DEAH-box DNA/RNA helicase. ATP-dependent helicase activity	ATP and acid nucleid binding	-1.54	0.00589
Gene expression	114600	TOP3	DNA gyrase subunit B-like protein	DNA-dependent DNA replication, DNA topological change, chromosome segregation. Cellular component: nucleoid	DNA-binding	-1.45	0.00113
Gene	195500	FKB16-2A	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Protein peptidyl-prolyl isomerization, cellular protein modification	Protein folding	-1.10	8.62e-05

expression				process, protein folding, peptidyl-proline modification			
Gene expression	136386	<i>CYN40</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type	Protein peptidyl-prolyl isomerization, protein folding. Cellular component: cytoplasm	Protein folding	-1.09	0.00272
Photosynthesis	184724	<i>LI818R-1</i>	LI818r-1 protein; Stress-related chlorophyll a/b binding protein 1	Photosynthesis, light harvesting, generation of precursor metabolites and energy	Chlorophyll binding	1.44	7.86e-07
Photosynthesis	150826	<i>TEF9</i>	Predicted protein	Pentose-phosphate shunt, cellular nitrogen compound metabolic process, carbohydrate metabolic process, catabolic process, rRNA processing, ribosome biogenesis, plastid organization, thylakoid membrane organization, photosystem II assembly, generation of precursor metabolites and energy, chlorophyll biosynthetic process, isopentenyl diphosphate biosynthetic process, methylerythritol 4-phosphate pathway, lipid metabolic process	-	1.06	0.00014
Energy	17807	<i>PUL1</i>	Pullulanase-type starch debranching enzyme	Maltose metabolic process, carbohydrate metabolic process, polysaccharide catabolic process, catabolic process, glycogen catabolic process, generation of precursor metabolites and energy, starch metabolic process, starch catabolic process, pentose-phosphate shunt, cellular nitrogen compound metabolic process, cofactor metabolic process, chlorophyll catabolic process, mRNA modification, isopentenyl diphosphate biosynthetic process, methylerythritol 4-phosphate pathway, glucosinolate metabolic process, sulfur compound metabolic process, alpha-amylase activity	Starch	-1.56	3.53e-06
Energy	58178	<i>AMYA2</i>	Alpha-amylase	Carbohydrate metabolic process, starch metabolic process, starch catabolic process, circadian rhythm, alpha-amylase activity, catalytic activity	Starch	-1.33	2.81e-05
Energy	187168	<i>AEP1</i>	Aldose-1-epimerase	Hexose metabolic process (carbohydrate metabolic process)	Carbohydrates	-1.33	0.000319
Energy	118976	<i>SBE1</i>	Starch branching enzyme	Carbohydrate metabolic process, glycogen biosynthetic process.	Starch	-1.32	0.00153
Energy	178381	<i>AIH2</i>	Agmatine iminohydrolase	Putrescine biosynthetic process, cellular nitrogen compound metabolic process, hydrolase activity, protein-arginine deiminase activity	-	-1.28	1.2e-05
Energy	179044	<i>BCS1</i>	Ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase biogenesis factor	Lipid metabolic process, sterol catabolic process, sterol esterification, mitochondrial respiratory chain complex III assembly, protein complex assembly, mitochondrion organization	Respiratory electron transport	-1.23	0.000239
Energy	196042	<i>IDH1</i>	Isocitrate dehydrogenase, NAD-dependent	Tricarboxylic acid cycle, oxidation-reduction process	TCA-cycle	-1.10	0.00633
Lipids	205994	<i>FAD5D</i>	Fatty acid desaturase	Lipid metabolic process, fatty acid biosynthetic process, oxidation-reduction process	FA-desaturase	-1.24	0.0076
Redox	171688	<i>SSA14</i>	Monoxygenase	Metabolic process, oxidation-reduction process, oxidoreductase activity	Oxidoreductase	-1.63	1.08e-06
Redox	196685	<i>CYP740A1</i>	Cytochrome P450, CYP85 clan	Oxidation-reduction process. Electron carrier activity, monoxygenase activity, oxidoreductase activity	Cytochrome P450	-1.37	0.00271
Redox	158152	<i>EZY22</i>	NAD-dependent epimerase/dehydratase; Predicted protein	Extracellular polysaccharide biosynthetic process, carbohydrate metabolic process, dTDP-4-dehydrorhamnose reductase activity,	Oxidoreductase	-1.28	7.86e-07

				oxidoreductase activity			
Redox	163751	<i>CBR1</i>	NADH-cytochrome b5 reductase	N-terminal protein myristoylation, electron transport chain, D-xylose metabolic process. cytochrome-b5 reductase activity, acting on NAD(P)H	Oxidoreductase	-1.21	0.000414
Redox	192806	<i>CCPR1</i>	Cytochrome c peroxidase	Response to oxidative stress, oxidation-reduction process	Oxidoreductase	-1.14	0.00011
Redox	186597	<i>APX1</i>	Ascorbate peroxidase	Peroxidase activity. Response to oxidative stress, Oxidation-reduction process	Oxidoreductase	-1.04	0.000589
Proteases	135149	<i>UBC3</i>	E2 ubiquitin-conjugating enzyme	Ligase activity, acid-amino acid ligase activity, SUMO ligase activity	Ubiquitinylation	-1.40	0.00695

9.2. Anexo II. Material suplementario proteómica

9.2.1. Proteínas diferencialmente expresados a las 3 h con respecto a los cultivos control (Proteómica 3 h)

Categories	Accession number	Protein name	Description	Biological process/molecular function	Process, group, domain	0.25 μ M:C	
						Ratio	p-value
Unknown	A1KR25	gp2	Cell wall glycoprotein GP2 (Fragment)	Cell wall glycoprotein GP2 (Fragment)	-	0.6918	0.0433
Other	A8HW56	CDC48, 134171	Flagellar associated protein	Motile cilium, ATPase activity, hydrolase	-	0.7798	0.0265
Other	A8IAN1	TRK1, 141319	Transketolase	Transketolase activity, transferase	-	0.7586	0.0309
Gen expression	A8HX38	EEF1, 132905, 134382	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	Translation elongation factor, GTPase activity	Ribosomes and translation	0.7244	0.0238
Photosynthesis	A8J0E4	PSBO, 130316	Oxygen-evolving enhancer protein 1 of photosystem	Photosystem II stabilization, photosynthesis	-	0.5495	0.001
Photosynthesis	A8IYP4	PRK1, 195910	Phosphoribulokinase	Phosphoribulokinase activity, chloroplast relocation, photosynthetic electron transport in photosystem I, reductive pentose-phosphate cycle, MAPK cascade, rRNA processing	Photosynthetic electron	0.4613	0.0029
Photosynthesis	P93109	ca2	alpha-carbonic anhydrase	Carbonate dehydratase activity, zinc ion binding	CCM	0.2466	0.0032
Photosynthesis	A8IYH9	PSBP1, 33411	Oxygen-evolving enhancer protein 2 of photosystem II	Photosystem II oxygen evolving complex, photosynthesis	-	0.4571	0.0055
Photosynthesis	A8JF15	ATPD, atpH, 132678	Chloroplast ATP synthase delta chain	Proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism, ATP synthesis coupled proton transport	Transport	0.4529	0.043
Energy	A8JC04	PGK1, 132210	Phosphoglycerate kinase	Glycolytic process, phosphoglycerate kinase activity, ATP binding	Glycolysis/gluconeogenesis	0.5395	0.003
Energy	Q42690	ALDCHL, 24459	Fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic	Fuctose-bisphosphate aldolase activity, glycolytic process	Glycolysis/gluconeogenesis	0.6368	0,0312
Energy	Q6SA05	Rca, RCA1, 128745	Rubisco activase	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activator activity, photosynthesis, light reaction, negative regulation of defense response	CO ₂ -assimilation	0.5598	0.0451

9.2.2. Proteínas diferencialmente expresados a las 24 h con respecto a los cultivos control (Proteómica 24 h)

Categories	Accession Number	Protein name	Description	Biological process/molecular function	Process, group, domain	0.25 μ M:C	
						Ratio	p-value
Other	A8IAN1	TRK1, 141319	Transketolase	Transketolase activity, transferase	-	1.4191	0.0279
Other	Q84X68	-	Flagella membrane glycoprotein 1B	Motile cilium,	-	0.3404	0.0006
Metabolism	A8IXZ0	TUB1, TUB2, 129868, 129876	Beta tubulin 1	Structural constituent of cytoskeleton, microtubule-based process, protein polymerization, Cytoskeleton	Cytoskeleton	0.6982	0.003
Gene expression	A8JEU4	HSP70A, 185673	Heat shock protein 70A	Response to endoplasmic reticulum stress, response to hydrogen peroxide, protein folding, stress response	Protein folding, heat shock proteins	0.4831	0.0471
Energy	A8JC04	PGK1, 132210	Phosphoglycerate kinase	Glycolytic process, phosphoglycerate kinase activity, ATP binding	Glycolysis/gluconeogenesis	3.4356	0.0192
Amino acids	A8J599	TSA1, 81238	Tryptophan synthetase alpha subunit	Tryptophan synthase activity	Amino acid biosynthesis, Trp	5.7544	0.0353
Redox	A8IAY6	111330	Methylenetetrahydrofolate reductase	Methionine metabolic process, tetrahydrofolate interconversion, oxidoreductase	Oxidoreductase	0.6918	0.0427

9.3. Anexo III. Publicaciones y comunicaciones en congresos

9.3.1. Publicaciones

- Seoane, M., **Esperanza, M.** & Cid, Á. (2017). Cytotoxic effects of the proton pump inhibitor omeprazole on non-target marine microalgae. *Aquatic Toxicology*, 191, 62-72. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.08.001
- Giraud, M., Cottin, G., **Esperanza, M.**, Gagnon, P., De Silva, A. & Houde, M. (2017). Transcriptional and cellular effects of benzotriazole UV-stabilizers UV-234 and UV-328 in the freshwater invertebrates, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9999. 1-10. doi: 10.1002/etc.3908
- **Esperanza, M.**, Houde, M., Seoane, M., Cid, Á., & Rioboo, C. (2017). Does a short-term exposure to atrazine provoke cellular senescence in *Chlamydomonas reinhardtii*?. *Aquatic Toxicology*, 189, 184-193. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.06.015
- Seoane, M., **Esperanza, M.**, Rioboo, C., Herrero, C., & Cid, Á. (2017). Flow cytometric assay to assess short-term effects of personal care products on the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Chemosphere*, 171, 339–347. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.12.097
- **Esperanza, M.**, Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., & Cid, Á. (2016). Early alterations on photosynthesis-related parameters in *Chlamydomonas reinhardtii* cells exposed to atrazine: A multiple approach study. *Science of Total Environment*, 554-555, 237-245. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.02.175
- **Esperanza, M.**, Cid, Á., Herrero, C., & Rioboo, C. (2015). Acute effects of a prooxidant herbicide on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: Screening cytotoxicity and genotoxicity endpoints. *Aquatic Toxicology*, 165, 210–221. doi:10.1016/j.aquatox.2015.06.004
- **Esperanza, M.**, Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., & Cid, Á. (2015). *Chlamydomonas reinhardtii* cells adjust the metabolism to maintain viability in response to atrazine stress. *Aquatic Toxicology*, 165, 64-72. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.05.012

9.3.2. Comunicaciones a congresos

- Seoane, M., **Esperanza, M.**, Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. Póster: Acute toxicity of omeprazole on the microalga *Tetraselmis suecica*, en el XII congreso de la FEMS (Federation of European Microbiological Societies) y XXVI congreso de la SEM (Sociedad Española de Microbiología), 9-13 de Julio 2017, Valencia (España).
- **Esperanza, M.**, Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. Póster: Microalgal premature senescence provoked by chemical stress, en el VII congreso de la FEMS (Federation of European Microbiological Societies) y XXVI congreso de la SEM (Sociedad Española de Microbiología), 9-13 de Julio 2017, Valencia (España).
- Seoane, M., **Esperanza, M.**, Herrero, C., Cid, Á. Póster: Reactive oxygen species overproduction on microalgal cells exposed to diverse pollutants, en el XV congreso de la Sociedad Ibérica de Citometría (XV SIC), 25-27 de Mayo 2017, Lisboa (Portugal).
- **Esperanza, M.**, Seoane, M., López, I., Rioboo, C. Póster: Influence of abscisic acid (ABA) on tolerance to heat shock in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, en el XV congreso de la Sociedad Ibérica de Citometría (XV SIC), 25-27 de Mayo 2017, Lisboa (Portugal).
- **Esperanza, M.**, Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. Póster: Proteomic analysis of atrazine stress response in *Chlamydomonas reinhardtii*, en el VII Congreso Europeo de Protistología (VII ECOP), 5-10 Septiembre del 2015, Sevilla (España).
- Seoane, M., **Esperanza, M.**, Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. Póster: Physiological alterations on the marine microalga *Tetraselmis suecica* exposed to the UV filter Benzophenone-3, en el 10º Congreso Ibérico y 7º Iberoamericano de Contaminación y Toxicología Ambiental (CICTA 2015), 14-17 de Julio del 2015, Vila Real (Portugal).
- **Esperanza, M.**, Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. Póster y comunicación oral: Análisis por RNA-Seq de la respuesta de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* al estrés producido por el herbicida atrazina, en el XXV Congreso Nacional de Microbiología de la SEM (Sociedad Española de Microbiología), 7-10 Julio del 2015, Logroño (España).
- Cid, Á., Prado, R., Rioboo, C., **Esperanza, M.**, Seoane, M., Herrero, C. Comunicación oral: Respuesta a estrés en microalgas: nuevos biomarcadores de citotoxicidad, en el XXV Congreso Nacional de Microbiología de la SEM (Sociedad Española de Microbiología), 7-10 Julio del 2015, Logroño (España).

- **Esperanza, M.**, Seoane, M., Rioboo, C. Herrero, C., Cid, Á. Póster: Efectos a corto plazo del herbicida atrazina sobre la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, en el XIV Congreso de la Sociedad Ibérica de Citometría (SIC), 4-6 Junio del 2015, Las Palmas de Gran Canaria (España).
- **Esperanza, M.**, Seoane, M., Cid, Á., Herrero, C., Rioboo, C. Comunicación oral: Citotoxicidad ejercida por el herbicida paraquat en la microalga de agua dulce *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard, presentado en el X Congreso de Microbiología del Medio Acuático de la SEM, 7-9 Septiembre del 2014, Elche, Alicante (España).
- Seoane, M., **Esperanza, M.**, Rioboo, C., Cid., Á. Comunicación oral: Alteración de parámetros fotosintéticos en la microalga marina *Tetraselmis suecica* en presencia de tres antibióticos utilizados en acuicultura, presentado por Marta Seoane en el X Congreso de Microbiología del Medio Acuático de la SEM, 7-9 Septiembre del 2014, Elche, Alicante (España).

