



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Departamento de Bioloxía

Área de Microbioloxía

Máster en Biotecnoloxía Avanzada

**Estudo da citotoxicidade provocada por microcontaminantes acuáticos
sobre a microalga doceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii***

**Estudio de la citotoxicidad provocada por microcontaminantes acuáticos
sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii***

**Study of cytotoxicity caused by aquatic micropollutants on the
freshwater microalga *Chlamydomonas reinhardtii***

TRABALLO FIN DE MÁSTER

Laura Míguez López

Febreiro, 2020



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Máster en Biotecnoloxía Avanzada

**Estudo da citotoxicidade provocada por microcontaminantes acuáticos sobre a
microalga doceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii***

**Estudio de la citotoxicidad provocada por microcontaminantes acuáticos sobre la
microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii***

**Study of cytotoxicity caused by aquatic micropollutants on the freshwater microalga
*Chlamydomonas reinhardtii***

Laura Míguez López

Este Traballo de Fin de Máster foi realizado no laboratorio de Microbioloxía do Departamento de Bioloxía da Universidade da Coruña, grazas ao financiamento acadado polo proxecto titulado “Parámetros de resposta citotóxica de microalgas para la prospección de efectos tóxicos de contaminantes emergentes en sistemas acuáticos marinos y dulceacuícolas” (referencia CTM2017-88668-R), do Ministerio de Ciencia y Universidades, do que é investigadora principal a Dra. Ángeles Cid Blanco, que en calidade de titora deste traballo autoriza a súa presentación ante o Tribunal Avaliador.

Asdo.: Dra. Ángeles Cid Blanco

A Coruña, 3 de febreiro de 2020

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMO	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
2. OBXECTIVO	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1. Descrición de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	8
3.2. Condicións de cultivo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	9
3.3. Compostos.....	9
3.4. Deseño experimental	11
3.5. Análises por citometría de fluxo	12
3.5.1. Determinación da densidade celular	13
3.5.2. Determinación das propiedades inherentes celulares	13
3.5.3. Determinación da viabilidade celular	14
3.5.4. Determinación da vitalidade celular ou actividade metabólica	14
3.5.5. Determinación do potencial de membrana citoplasmática	15
3.5.6. Determinación do nivel de ROS	16
3.6. Determinación da peroxidación lipídica	16
3.7. Determinación do rendemento ou eficacia fotosintética, PAM	17
3.9. Análise estatística	17
4. RESULTADOS E DISCUSIÓN	18
4.1. Propiedades inherentes e crecemento celular	18
4.2. Viabilidade e vitalidade celular e potencial de membrana	20
4.3. Fluorescencia da clorofila <i>a</i> e PAM	24
4.4. Estrés oxidativo	25
5. CONCLUSIÓNS	28
6. BIBLIOGRAFÍA	29

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
ANOVA	Análise da varianza, <i>Analysis of variance</i>
ARN	Ácido ribonucleico, <i>Ribonucleic acid</i>
ATZ	Atrazina, <i>Atrazine</i>
BP-3	Benzofenona-3, <i>Benzophenone-3</i>
BPA	Bisfenol A, <i>Bisphenol A</i>
CCAP	Colección de Cultivos de Algas e Protozoos, <i>Culture Collection of Algae and Protozoa</i>
CE	Comisión Europea, <i>European Commission</i>
CMF	Citometría de fluxo, <i>Flow Cytometry</i>
DiBAC ₄ (3)	Bis-(1,3-ácido dibutilbarbitúrico) trimetino oxonol, <i>Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol</i> .
DHR123	Dihidrorrodamina 123, <i>Dihydrorhodamine 123</i>
DTT	Ditiotreitol, <i>Dithiothreitol</i>
EC ₅₀	Concentración efectiva media, <i>Half maximal Effective Concentration</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético, <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EU	Unión europea, <i>European Union</i>
FDA	Diacetato de fluoresceína, <i>Fluorescein diacetate</i>
FL	Fluorescencia, <i>Fluorescence</i>
FS	Luz refractada cara adiante, <i>Forward Scatter light</i>
GC	Guanina e citosina, <i>Guanine and Cytosine</i>
IP	Ioduro de propidio, <i>Propidium iodide</i>
MDA	Malondialdehído, <i>Malondialdehyde</i>
OTC	Oxitetraciclina, <i>Oxytetracycline</i>
PAM	Modulación por amplitude de pulso, <i>Pulse Amplitude Modulation</i>
PBS	Tampón fosfato salino, <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCPs	Produtos de coidado e hixiene persoal, <i>Personal Care Products</i>
PL	Peroxidación lipídica, <i>Lipid peroxidation</i>
PSII	Fotosistema II, <i>Photosystem II</i>
QY	Rendemento fotosintético, <i>Quantum Yield</i>
ROS	Especies reactivas de osíxeno, <i>Reactive Oxygen Species</i>
SS	Luz refractada lateralmente, <i>Side Scatter light</i> ,

TAP	Tris-acetato-fosfato, <i>Tris-Acetate-Phosphate</i>
TBA	Ácido tiobarbitúrico, <i>Thiobarbituric acid</i>
TBARS	Substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
T.C.	Taxa de crecimiento, <i>Growth rate</i>
TCA	Ácido tricloracético, <i>Trichloroacetic acid</i>
UV	Ultravioleta, <i>Ultraviolet</i>

RESUMO

As actividades humanas xeran multitude de compostos contaminantes que acaban chegando ás augas, provocando efectos negativos sobre os ecosistemas acuáticos, os organismos que habitan neles e sobre a nosa saúde. Estes pódense clasificar en prioritarios, como a atrazina (ATZ), un herbicida cuxa presenza no ambiente está regulada por lei; e emerxentes, como a benzofenona-3 (BP-3), o bisfenol A (BPA) e a oxitetraciclina (OTC), que se corresponden con un filtro solar, un aditivo químico e un antibiótico, respectivamente, os cales non dispoñen dunha lexislación que rexa a súa presenza no medio. No presente traballo estudárase a resposta da microalga de auga doce, *Chlamydomonas reinhardtii*, a estes catro compostos tras 24 h de exposición, para poder determinar se existe unha resposta universal por parte desta a tódolos contaminantes citados. Para isto, examináronse distintos parámetros en relación aos posibles efectos citotóxicos provocados, tales como: crecemento celular, propiedades intrínsecas das células, viabilidade e vitalidade celular, potencial de membrana citoplasmática, produción de ROS, peroxidación lipídica e rendemento ou eficacia fotosintética. Os resultados evidenciaron a toxicidade dos catro contaminantes ensaiados sobre a microalga, desencadeando a mesma resposta para os parámetros: taxa de crecemento, fluorescencia da clorofila *a*, vitalidade celular, potencial de membrana e rendemento fotosintético. Ademais, pódense diferenciar dous grupos de contaminantes, por un lado o BP-3 e o BPA, que afectaron a tódolos parámetros cun mesmo patrón de resposta, e por outro a OTC e a ATZ, que mostraron un patrón de resposta moi similar entre elas e uns niveis de viabilidade e ROS sen alteracións respecto aos controis.

Palabras chave: *Chlamydomonas reinhardtii*, microalga doceacuícola, contaminantes emerxentes, contaminantes prioritarios, citometría de fluxo, citotoxicidade.

RESUMEN

Las actividades humanas generan multitud de compuestos contaminantes que acaban llegando a las aguas, provocando efectos negativos sobre los ecosistemas acuáticos, los organismos que habitan en ellos y sobre nuestra salud. Estos se pueden clasificar en prioritarios, como la atrazina (ATZ), un herbicida cuya presencia en el ambiente está regulada por ley; y emergentes, como la benzofenona-3 (BP-3), el bisfenol A (BPA) y la oxitetraciclina (OTC), que se corresponden con un filtro solar, un aditivo químico y un antibiótico, respectivamente, que no disponen de una legislación que rijan su presencia en el medio. En el presente trabajo se estudiará la respuesta de la microalga de agua dulce, *Chlamydomonas reinhardtii*, a estos cuatro compuestos tras 24 h de exposición, para poder determinar si existe una respuesta universal por parte de ésta a todos los contaminantes citados. Para esto se examinaron distintos parámetros en relación a los posibles efectos citotóxicos provocados, tales como: crecimiento celular, propiedades intrínsecas de las células, viabilidad y vitalidad celular, potencial de membrana citoplasmática, producción de ROS, peroxidación lipídica y rendimiento o eficacia fotosintética. Los resultados evidenciaron la toxicidad de los cuatro contaminantes ensayados sobre la microalga, desencadenando la misma respuesta por los parámetros: tasa de crecimiento, fluorescencia de la clorofila *a*, vitalidad celular, potencial de membrana y rendimiento fotosintético. Además, se pueden diferenciar dos grupos de contaminantes, por un lado el BP-3 y el BPA, que afectaron a todos los parámetros con un mismo patrón de respuesta, y por otro la OTC y la ATZ, que mostraron un patrón de respuesta muy similar entre ellas y unos niveles de viabilidad y ROS sin alteraciones con respecto a los controles.

Palabras clave: *Chlamydomonas reinhardtii*, microalga dulceacuícola, contaminantes emergentes, contaminantes prioritarios, citometría de flujo, citotoxicidad.

ABSTRACT

Human activities generate a multitude of polluting compounds that end up reaching the waters, causing negative effects on aquatic ecosystems, on the organisms that inhabit them and on our health. These can be classified as priority pollutants, such as atrazine (ATZ), a herbicide whose presence in the environment is regulated by law; and emerging pollutants, such as benzophenone-3 (BP-3), bisphenol A (BPA) and oxytetracycline (OTC), which correspond to a sunscreen, a chemical additive and an antibiotic, respectively, that do not have legislation governing its presence in the environment. In this paper we will study the response of the freshwater microalga, *Chlamydomonas reinhardtii*, to these four compounds after 24 hours of exposure, in order to determine if there is a universal response by the latter to all the pollutants aforementioned. For this purpose, different parameters have been examined in relation to the possible cytotoxic effects caused, such as: cell growth, intrinsic cell properties, cell viability and vitality, cytoplasmic membrane potential, ROS production, lipid peroxidation and photosynthetic performance or efficiency. The results proved the toxicity of the four pollutants tested on the microalgae, triggering the same response for the parameters: growth rate, chlorophyll a fluorescence, cell vitality, membrane potential and photosynthetic performance. In addition, two groups of pollutants can be distinguished. On the one hand the BP-3 and the BPA, which affected all the parameters with the same response pattern, and on the other the OTC and the ATZ, which showed a similar response pattern and levels of viability and ROS without alterations with respect to controls.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, freshwater microalga, emerging pollutants, priority pollutants, flow cytometry, cytotoxicity.

1. INTRODUCCIÓN

A contaminación das augas e o seu efecto sobre os ecosistemas acuáticos son problemas ambientais graves aos que nos enfrontamos na actualidade. Máis dun terzo da auga doce accesible da Terra é utilizada para fins agrícolas, industriais e domésticos, ocasionando a súa contaminación con diversos compostos químicos (Loos *et al.*, 2009), de maneira que estes ecosistemas encóntranse sometidos a unha presión crecente como resultado das actividades antropoxénicas (Villanueva *et al.*, 2011), o que tamén resulta nunha perda continua de biodiversidade (Borgwardt *et al.*, 2019; Lago *et al.*, 2019) debido aos efectos de toxicidade aguda e crónica que poidan exercer ditos contaminantes sobre os organismos acuáticos (Sánchez-Avila *et al.*, 2012).

Dende a Unión Europea recoñécese e trátase este problema mediante directivas como a 2000/60/CE, pola que se establece un marco comunitario de actuación no ámbito da política de augas. Nesta directiva estipúlase unha lista de substancias prioritarias, é dicir, substancias químicas tóxicas, persistentes e bioacumulables, entre as cales se poden encontrar metais pesados, herbicidas, praguicidas, etc., cuxa presenza no medio ambiente está regulada por lei. Ademais, noutra directiva de interese, a 2013/39/EU, defínense os chamados contaminantes “emerxentes” como aqueles contaminantes que na actualidade non están incluídos nos programas de seguimento sistemático na Unión Europea, pero que supoñen un importante risco, o cal esixe a súa regulación, dependendo dos seus posibles efectos (eco)toxicolóxicos, e dos seus niveis no medio acuático.

Entre a ampla gama de produtos incluídos dentro deste grupo encóntranse compostos de distinta orixe e natureza química, como fármacos (antibióticos, analxésicos, antihipertensivos,...), produtos de coidado persoal (PCPs) (filtros solares, fragancias,...), drogas ilícitas, hormonas, axentes tensioactivos, aditivos industriais, etc. (Gil *et al.*, 2012). Trátase de compostos dos que relativamente se sabe pouco, resultando así susceptibles de investigación para poder ser incluídos en regulacións futuras. Polo xeral, encóntranse en concentracións moi baixas (partes por millón ou por trillón) (García-Gómez *et al.*, 2011), pero a súa liberación constante ao medio provoca que se atopen de forma ubicua nel (Ebele *et al.*, 2017).

Deste xeito, debido a gran cantidade de produtos químicos que poden chegar aos sistemas de augas superficiais e subterráneas, e os seus imprevisibles efectos ambientais e de saúde a longo prazo (Guillén *et al.*, 2012), xurde a necesidade de utilizar métodos

analíticos máis sensibles que sexan capaces de detectar a presenza destes compostos na auga, e de parámetros que permitan a avaliación da súa toxicidade en organismos acuáticos (Prado *et al.*, 2015), integrando así, o seguimento de efectos biolóxicos nos plans de seguimento ambiental tradicionalmente baseados no seguimento de contaminantes, para obter unha visión máis integral dos seus efectos sobre a biota (Lam e Gray, 2003).

Dentro da diversidade de organismos acuáticos, as algas unicelulares son escollidas con frecuencia para a realización de estudos de detección ecotoxicolóxica de augas contaminadas e de bioensaios de toxicidade *in vitro* (Seoane *et al.*, 2017), dada a súa importancia a nivel ecolóxico, xa que, como produtores primarios, cumpren funcións esenciais na cadea alimentaria, e calquera efecto prexudicial sobre elas podería repercutir negativamente no resto de ecosistemas (DeLorenzo *et al.*, 2001; Esperanza, *et al.*, 2015a; González-Pleiter *et al.*, 2017).

Neste estudo utilizaremos, en concreto, a microalga verde doceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii*. Trátase dun organismo tradicionalmente empregado en bioloxía molecular, como modelo para a investigación de procesos celulares como a fotosíntese, a percepción da luz e a estrutura, función e bióxénese dos cilios, entre outros (Sasso *et al.*, 2018). Dende fai uns anos tamén gañou peso como modelo para as análises toxicolóxicas ambientais, debido a que se encontra de forma común en solos e auga doce e a súa sensibilidade fronte a diferentes contaminantes (Esperanza *et al.*, 2015a).

Entre as análises para avaliar os efectos tóxicos sobre as microalgas, a citometría de fluxo postulouse como unha alternativa aos criterios de valoración estándar, baseados na poboación microalgal, xa que posibilita unha toma de medidas rápida, cuantitativa e de forma simultánea de múltiples respostas ó estrés tóxico, en células individuais en condicións próximas ao estado *in vivo* (Esperanza *et al.*, 2015a; Prado *et al.*, 2015; Cid *et al.*, 1999).

2. OBXECTIVO

O obxectivo que se persegue con este estudo é poder determinar os efectos citotóxicos que exercen catro compostos, tres deles incluídos dentro dos chamados contaminantes emerxentes, tales como: o filtro solar benzofenona-3 (BP-3), o produto químico bisfenol A (BPA) e o antibiótico oxitetraciclina (OTC); e o cuarto, pertencente os coñecidos como contaminantes prioritarios, o herbicida atrazina (ATZ), sobre a microalga doceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii*, para poder determinar, en última instancia, se existe unha resposta universal desta fronte a todos estes compostos ou a resposta depende de cada contaminante.

Para isto, os efectos avaliáronse mediante a análise de distintos parámetros como o crecemento celular, as propiedades intrínsecas das células, a viabilidade e vitalidade celular, o potencial de membrana citoplasmática, a produción de ROS, a peroxidación lipídica e o rendemento ou eficacia fotosintética. Para que a comparativa fose posible, a concentración ensaiada de cada un dos contaminantes correspóndese coa concentración que reduce nun 50% o crecemento desta microalga ás 96 horas de cultivo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Descrición de *Chlamydomonas reinhardtii*

O organismo escollido para a realización deste estudo foi a microalga doceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard. Máis concretamente seleccionouse a cepa CCAP 11/32A mt+, proporcionada pola Colección de Cultivos de Algas e Protozoos (Culture Collection of Algae and Protozoa, CCAP) do Laboratorio Mariño de Dunstaffnage (Escocia, Reino Unido).

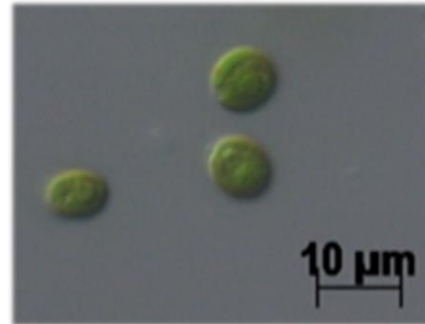


Figura 1. Células de *Chlamydomonas reinhardtii* ao microscopio (<https://www.ccap.ac.uk/results2014.php>)

Segundo a clasificación de Bold e Wynne (1985), o xénero ao que pertence encádrase dentro da división *Chlorophyta*, na clase *Chlorophyceae*, orde *Volvocales* e familia *Chlamydomonadaceae*. É un xénero moi amplo e cunha gran distribución, encontrándose en multitude de hábitats (Harris, 2009).

Trátase dunha alga verde unicelular, de forma elipsoidal, duns 10 μm de diámetro, con flutuacións ao longo do seu ciclo celular (Harris, 2001). O núcleo, que varía entre os 2–4 μm de diámetro (Hummel *et al.*, 2012), contén o xenoma nuclear, rico en GC e cun tamaño aproximado de 121 Mb, está composto por 17 cromosomas (Merchant *et al.*, 2007). O xenoma mitocondrial é lineal, de 15,8 kb (Harris, 2001; Sasso *et al.*, 2018) e as mitocondrias encóntranse dispersas por todo citosol, mentres que o único cloroplasto que posúe, atópase rodeando parcialmente o núcleo, ocupando así gran parte da rexión basal da célula (Harris, 2001), o seu xenoma ten un tamaño de 206 kb (Sasso *et al.*, 2018). Conta con dous flaxelos, que emerxen dos corpos basais no extremo anterior e que lle serven ademais de para moverse, para detectar as condicións ambientais, entre outras utilidades (Merchant *et al.*, 2007; Hummel *et al.*, 2012).

As células vexetativas de *C. reinhardtii* son haploides, e poden reproducirse de forma asexual ou sexual (Harris, 2001; Jeanneret *et al.*, 2016). Neste estudo empregáronse células dunha mesma condición, as *mating tipe +*, para evitar desta forma o apareamento entre os dous tipos opostos (mt + e mt-).

Esta especie resultou de gran interese en investigación como modelo biolóxico, xa que posúe determinadas características que a fan idónea para o traballo en laboratorio, como crecemento rápido, facilidade de cultivo, haploidía e a posibilidade de inducir a reprodución sexual (Harris, 1989, 2001; Esperanza *et al.*, 2017), ademais de dispor do seu xenoma secuenciado (Merchant *et al.*, 2007; Esperanza *et al.*, 2017).

3.2. Condicións de cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*

O cultivo desta especie de alga require de medio TAP (*Tris-Acetate-Phosphate*) inorgánico (Gorman e Levine, 1965; Harris, 2009), con pequenas variacións na súa composición, como a ausencia de fonte orgánica de carbono e nitrato como fonte de nitróxeno (Esperanza, 2017). Este medio prepárase en auga destilada e posteriormente axústase o pH a 7,0 con HCl ao 37 % e esterilízase en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Unha vez arrefría, é preciso engadir, en condicións de esterilidade, 3 mL L⁻¹ dunha solución stock de oligoelementos, necesarios para o correcto crecemento das microalgas, preparado con 0,25 g de Algal (AQUALGAL S.L.) en 50 mL de auga destilada, e esterilizado previa utilización.

Os cultivos stock, dos que se parte para levar a cabo cada unha das experiencias, realizáronse en matraces Pyrex de 500 mL, en condicións axénicas. Mantivéronse baixo condicións controladas, sen aireación e en axitación constante, proporcionada por axitadores orbitais, a 150 rpm, para manter as células continuamente en suspensión e evitar a formación de gradientes de luz e/ou nutrientes. A fonte de iluminación, de 100 µmol fotón m⁻² s⁻¹, foi subministrada por tubos LED, coa aplicación dun ciclo de luz/escuridade de 12/12 h. A temperatura mantívose constante a 22 ± 1°C.

Para que o cultivo se encontrase no momento óptimo para a súa utilización, neste caso, a fase expoñencial de crecemento, procedeuse a súa renovación dúas veces por semana. En todas as experiencias pártese dunha densidade celular de 2 x 10⁵ células mL⁻¹, a partir do cultivo stock.

3.3. Compostos

No presente estudo realizáronse tratamentos con catro compostos de diferente natureza, como a benzofenona-3 (BP-3), o bisfenol A (BPA), a oxitetraciclina (OTC) e a atrazina (ATZ), escollidos debido a crecente preocupación que suscita a súa presenza, en maior ou

menor medida, no medioambiente. Todos eles cun grao de pureza superior ao 95 % e comercializados por Sigma-Aldrich, a excepción da ATZ, comercializada por Fluka.

- Benzofenona-3 ou oxibenzona (2-hidroxi-4-metoxibenzofenona; BP-3):

É un composto orgánico que forma cristais incoloros facilmente solubles na maioría de solventes orgánicos (DrugBank, 2007). Funciona como absorbente UV de amplo espectro, absorbendo a radiación na rexión comprendida entre os 290-440 nm (Du *et al.*, 2017). Prodúcese de forma natural nos pigmentos das flores e sintetízase a nivel industrial para o seu uso en cosmética en produtos de protección solar e de coidado persoal (PCPs); así como noutras industrias, para recubrimentos, polímeros de superficies de plástico, etc. (Huo *et al.*, 2016).

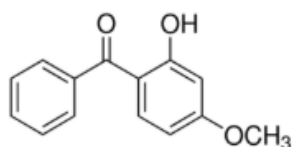


Figura 2. Estrutura química da benzofenona-3 (BP-3)

(<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/oxybenzone2282413157711?lang=es®ion=ES>)

- Bisfenol A (4,4'-dihidroxi-2,2-difenilpropano; BPA):

É un composto orgánico con dous grupos hidroxifenilo, de cor branca e sólido a temperatura ambiente (Geueke, 2014). O seu uso está moi estendido na industria, xa que se emprega na fabricación de plásticos de policarbonato e resinas epoxi, que son utilizados como materiais para o envasado de alimentos/bebidas, entre outros usos (Juan-García *et al.*, 2015).

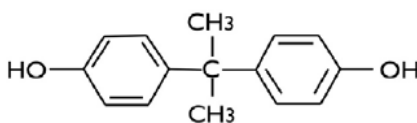


Figura 3. Estrutura química do bisfenol A (BPA)

(Juan-García *et al.*, 2015)

- Oxitetraciclina ((4*S*,4*aR*,5*S*,5*aR*,6*S*,12*aS*) – 4 – (dimetilamino) – 3,5,6,10,11,12*a* – hexahidroxi – 6 – metil – 1,12– dioxo - 1,4,4*a*,5,5*a*,6,12,12*a* – octahidrotetracén – 2 – carboxamida; OTC):

É un antibiótico de amplo espectro, incluído dentro do grupo das tetraciclina, de uso moi estendido, tanto para o tratamento de infeccións humanas como animais (Chopra

e Roberts, 2001). Este grupo de compostos comparten un estrutura común de octahidronaftaleno, constituída por catro aneis condensados, e o seu mecanismo de acción basease na inhibición da síntese proteica bacteriana (Aguilera *et al.*, 2010).

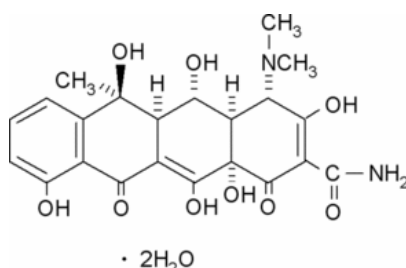


Figura 4. Estrutura química da oxitetraciclina (OTC)

(<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/oxytetracycline49646615364611?lang=es®ion=ES>)

- Atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-1,3,5-triazina; ATZ):

Trátase dun herbicida soluble en auga, que en estado puro se presenta en forma de po de cor branca (ATSDR, 2003). Actúa sobre o fotosistema II (PSII), bloqueando a cadea de transporte electrónico, inhibindo polo tanto a fotosíntese (Rutherford e Krieger-Liszay, 2001). É un dos herbicidas máis utilizados en todo o mundo, mais o seu uso está prohibido na Unión Europea e noutros países europeos (Fernández-Naveira *et al.*, 2016).

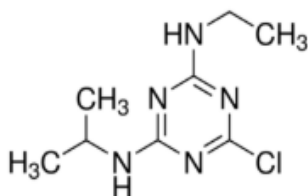


Figura 5. Estrutura química da atrazina (ATZ)

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

3.4. Deseño experimental

Os ensaios realizados para avaliar os posibles efectos tóxicos dos catro contaminantes mencionados anteriormente, sobre a microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, tiveron unha duración de 24 h.

Previamente a comezar cada experimento, preparáronse as solucións stock de todos os compostos, disolvéndooos en metanol. As concentracións de cada contaminante escolléronse en base á concentración efectiva media ou EC₅₀ (polas súas siglas en inglés *Effective Concentration 50 %*), que se trata da concentración do contaminante que reduce nun 50 % a taxa de crecemento algal, neste caso ás 96 h para o crecemento, de estudos

previos do grupo de investigación: 5 mg L⁻¹ para o BP-3 (Esperanza *et al.*, 2019), 30 mg L⁻¹ para o BPA (datos non publicados), 2,5 mg L⁻¹ para a OTC (Conde, 2017) e 0,054 mg L⁻¹ para a ATZ (Esperanza *et al.*, 2015). O volume que se engade de cada contaminante nunca supera o 0,05 % do volume final de cultivo. Aos controis engádeselle o mesmo volume de metanol, sen contaminante algún, posto que se verificou que non existen diferenzas significativas entre os cultivos con e sen adición de metanol (Esperanza *et al.*, 2019).

Os cultivos experimentais elaboráronse a partir do cultivo stock en fase de crecemento expoñencial, axustando a concentración dos inóculos para obter una densidade inicial de 2 x 10⁵ células mL⁻¹ nun volume de 30 mL en matraces *Pyrex* de 100 mL, para todas as experiencias, a excepción das realizadas para a peroxidación lipídica e a expresión xénica, onde o volume final foi de 60 mL e os matraces empregados de 250 mL. Estes cultivos mantivéronse baixo as mesmas condicións que os cultivos stock. Os ensaios para cada tratamento realizáronse por triplicado, ademais dos controis sen contaminante, a excepción da experiencia para peroxidación lipídica, que se realizou por duplicado.

3.5. Análises por citometría de fluxo

As análises por citometría de fluxo dos cultivos leváronse a cabo nun citómetro de fluxo Gallios (Beckman Coulter Inc.), provisto con dous láseres de excitación, un que emite a 488 nm (luz azul) e outro a 633 nm (luz vermella). Tamén dispón de detectores de luz refractada no ángulo anterior (*forward scatter light*, FS), que proporciona información acerca do tamaño celular, e de luz refractada no ángulo lateral (*side scatter light*, SS), que da información sobre a complexidade ou granularidade intracelular. Ademais, tamén presenta catro detectores de fluorescencia para distintos intervalos de lonxitude de onda: FL1 (fluorescencia verde, 505-545 nm), FL2 (fluorescencia amarela, 560-590 nm), FL3 (fluorescencia alaranxada, 605-635 nm) e FL4 (fluorescencia vermella, 660-700 nm).

Para levar a cabo as distintas análises, tomáronse alícuotas de cada cultivo tratado e dos controis, diluíndoos en tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline*), co fin de obter unha densidade final en todos eles de 2 x 10⁵ células mL⁻¹. As suspensións celulares incubáronse cos distintos fluorocromos utilizados, en escuridade, e seguindo os protocolos que se comentarán a continuación.

Os resultados das análises citométricas preséntanse en forma de histogramas de distribución da poboación celular con respecto aos parámetros analizados. Estes datos gárdanse como arquivos *listmode*. Mediante o *software Kaluza Flow Cytometry Analysis V.1.1*. (Beckman Coulter Inc.) pódense visualizar e analizar os parámetros estatísticos e as gráficas dos valores que se acadaron mediante esta técnica.

3.5.1. Determinación da densidade celular

A determinación da densidade celular de cada unha das condicións a estudar levouse a cabo mediante o seu recuento por CMF. Para isto tomáronse alícuotas de cada cultivo ás 24 h e engadiuse unha suspensión de concentración coñecida de fluoroesferas, *Flow-Count Fluorospheres* (Beckman Coulter Inc.), para un volume final de 500 μL . Estas emiten fluorescencia entre os 525 nm e 700 nm cando se excitan a 488 nm.

As taxas de crecemento (T.C. ou μ) exprésanse como día^{-1} e calcúlanse mediante a fórmula:

$$\mu = [\ln(N_t) - \ln(N_0)] / \ln 2 (t-t_0)$$

onde (t) e (t_0) correspóndense co tempo final e inicial do estudo, respectivamente, expresados en días, e (N_t) e (N_0) co número de células, expresadas en mL^{-1} neses mesmos tempos.

3.5.2. Determinación das propiedades inherentes celulares

Mediante CMF puidéronse analizar parámetros como o tamaño ou volume celular, a complexidade ou granularidade intracelular e a autofluorescencia das microalgas sometidas aos distintos tratamentos. Ditos parámetros estúdanse directamente a partir das células en suspensión, sen necesidade de tinguilas con ningún fluorocromo.

Tamaño ou volume celular:

A luz refractada no ángulo anterior ou frontal (*forward scatter light*, FS) correspóndese co detector que recolle a luz dispersada do láser entre 1 e 20° respecto ao feixe. As medidas deste correlaciónanse co tamaño ou volume das células. A intensidade de FS aumenta co aumento da área da sección transversal da célula (Shapiro, 1995).

Complexidade ou granularidade intracelular:

A luz refractada no ángulo lateral (*side scatter light*, SS) correspóndese co detector que recada a luz dispersada 90° con respecto ao feixe. Estas medidas son un reflexo da complexidade interna das células (Shapiro, 1995).

Fluorescencia da clorofila *a*:

As microalgas conteñen clorofilas e outros pigmentos accesorios que provocan autofluorescencia de forma natural. A fluorescencia da clorofila *a* excítase con luz a 488 nm e emite no rango de 680-720 nm, polo que é captada polo detector FL4 (Prado *et al.*, 2011).

3.5.3. Determinación da viabilidade celular

Para analizar a viabilidade celular dos cultivos tratados cós distintos contaminantes fronte ao control, mediante citometría de fluxo, utilizouse o fluorocromo ioduro de propidio (IP), de uso estendido en estudos de toxicidade.

O ioduro de propidio é un axente intercalante que se une aos pares de bases dos ácidos nucleicos de dobre cadea, tanto ARN como ADN (Krishan *et al.*, 1978). A súa utilidade no método baséase en que as células coa membrana plasmática intacta son impermeables a el, en cambio cando a integridade desta se ve alterada, o fluorocromo ten acceso o núcleo e provoca a aparición de fluorescencia ao unirse cos ácidos nucleicos (Brana *et al.*, 2002). Desta forma, mediante a análise no citómetro de fluxo, podemos distinguir células viables non fluorescentes (IP-) de células non viables fluorescentes (IP+).

Este fluorocromo produce fluorescencia vermella, que é recollida no detector FL3 (605-635 nm), en escala logarítmica. As alícuotas dos cultivos a valorar incubáronse con unha concentración final de 4 µM de IP, por un período de tempo de 10 min, en escuridade e a temperatura ambiente (Prado *et al.*, 2009).

3.5.4. Determinación da vitalidade celular ou actividade metabólica

A vitalidade celular ou actividade metabólica dos cultivos experimentais avalíouse mediante un ensaio de actividade esterasa celular, baseada en diacetato de fluoresceína ou FDA (polas súas siglas en inglés, *fluorescein diacetate*).

O FDA é unha substancia non polar e non fluorescente que entra nas células libremente (Ross *et al.*, 1989). Unha vez no interior destas, as esterasas intracelulares escinden os residuos de acetato e como produto obtense fluoresceína, substancia hidrofílica e fluorescente, que queda atrapada no interior das células que posúen a integridade da súa membrana intacta, mentres que nas se veu afectada, a fluoresceína difunde e non se acumula (Seoane *et al.*, 2017). O feito de que se acumule ou non fluoresceína nas células orixina que se poida medir a actividade metabólica a través da media da intensidade da fluorescencia emitida polas células, sendo proporcional á cantidade de fluoresceína retida e ao tempo discorrido (Prado *et al.*, 2009). Deste xeito pódese distinguir entre células metabolicamente activas (FDA+) e células non metabolicamente activas (FDA-).

A fluoresceína emite fluorescencia no rango dos verdes, polo que é recollida no detector FL1 (505-545 nm) en escala logarítmica. As suspensións microalgais incubáronse con unha concentración final de 0,12 μM de FDA, durante 15 min, en escuridade e a temperatura ambiente (Prado *et al.*, 2009).

3.5.5. Determinación do potencial de membrana citoplasmática

O estudo do potencial de membrana citoplasmática púidose efectuar mediante a utilización do fluorocromo bis-(1,3-ácido dibutilbarbiturico) trimetino oxonol (DiBAC₄(3)). Calquera alteración neste parámetro pode ser indicativo do estado das células (Humphreys *et al.*, 1994).

DiBAC₄(3) é un indicador de resposta lenta, lipofílico e cargado negativamente (Wolff *et al.*, 2003), que entra facilmente nas células despolarizadas, onde tende a unirse a compoñentes intracelulares ricos en lípidos. O aumento da súa concentración a nivel intracelular é indicativo polo tanto de despolarización e provoca un aumento da fluorescencia (Jepras *et al.*, 1997; Wolff *et al.*, 2003).

A fluorescencia deste fluorocromo é captada polo detector FL1 (505-545 nm) en escala logarítmica. Os cultivos experimentais incubáronse cunha concentración final de 0,97 μM de DiBAC₄(3), durante 10 min, en condicións de escuridade e a temperatura ambiente (Prado *et al.*, 2012).

3.5.6. Determinación do nivel de ROS

A valoración deste parámetro baséase na determinación dos niveis intracelulares de peróxido de hidróxeno (H_2O_2), unha especie reactiva de osíxeno (*reactive oxygen species*; ROS), mediante a utilización da dihidrorrodamina 123 (DHR 123).

O DHR 123 é unha molécula lipofílica que difunde facilmente a través das membranas celulares (Crow, 1997), unha vez dentro da célula é oxidada polos radicais libres presentes, producindo rodamina 123, unha sonda fluorescente, catiónica e lipofílica, que queda atrapada no espazo intracelular (Gomes *et al.*, 2005; Yazdani, 2015).

A fluorescencia do DHR 123 rexístrouse en escala logarítmica polo detector FL1 (505-545 nm). As suspensións microalgais incúbanse con unha concentración de fluorocromo de 29 μM , durante 40 min, en escuridade e a temperatura ambiente (Prado *et al.*, 2012).

3.6. Determinación da peroxidación lipídica

A peroxidación lipídica está causada pola presenza de ROS, que provocan dano oxidativo ás biomacromoléculas (Wei *et al.*, 2000). O método utilizado neste estudo para a súa determinación, descrito por Heath e Packer (1968) con algunhas modificacións, baséase en que o malondialdehído (MDA), que é un produto da peroxidación de ácidos graxos poliinsaturados, reacciona co ácido tiobarbitúrico (TBA), dando como resultado un complexo coloreado (TBARS), medible por absorbancia a 532 nm (Ersan *et al.*, 2006).

Partiuse do pellet obtido a partir da centrifugación de 45 mL de cada cultivo e resuspendeuse en 800 μL de tampón de homoxeneización, cuxa composición é: 140 mM NaCl, 25 mM Tris, 0,1 mM EDTA e 0,1 mM DTT, axustándose posteriormente o pH a 7,5 con HCl. A continuación procedeuse á rotura celular no Mini-Beadbeater, con 2 ciclos de 1 min cada mostra, coa utilización dunha mestura de bolas 0,5 e 0,1 mm de vidro e 0,1 mm de circonio; e sonicación a 400 mA durante 2 min, por mostra, con descansos en xeo. Esta suspensión celular centrifugouse e do sobrenadante pipeteáronse 400 μL , que se mesturaron con 500 μL de ácido tricloroacético (TCA) (10 %, p/v) e 250 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,67 % , p/v). A mixtión incubouse durante 30 min a 100 °C e posteriormente arrefriouse en xeo durante 10 min. Unha vez pasado este tempo, mediuse no espectrofotómetro (Shimadzu UV-160) a 532 nm. Para corrixir a turbidez, restóuselle a absorbancia da mostra a 600 nm. O branco realizouse con TBA e TCA co mesmo p/v.

3.7. Determinación do rendemento ou eficacia fotosintética, PAM

O rendemento ou eficacia fotosintética analizouse por fluorimetría mediante PAM (*Pulse Amplitude Modulation*), empregando o fluorímetro AquaPen-C-AP-C100. Este dispositivo, de gran sensibilidade, está equipado cun lector de cubetas e dúas fontes de emisión de luz, unha azul (455 nm), adicada á excitación da clorofila microalgal, e a outra vermella (620 nm), adicada a excitación de ficobilinas de cianobacterias.

A fluorescencia medida por PAM reflexa a eficiencia da conversión de enerxía fotoquímica dos centros de reacción do PSII (Garrido *et al.*, 2013). Previamente a realización das medidas, tomáronse 3 mL de cada cultivo e incubáronse en escuridade durante 30 min, para asegurarse de que todos os centros de reacción do PSII están “abertos”, momento no que os mecanismos de disipación de enerxía, como o é a emisión de fluorescencia, son mínimos e o rendemento fotosintético ou *quantum yield* (QY) é máximo. Cando as alicuotas son iluminadas polo dispositivo, prodúcese o “peche” dos centros de reacción debido a absorción de luz. O exceso de irradiación induce procesos de disipación de enerxía, polo que aumenta a emisión de fluorescencia e diminúe o QY (Kromkamp *et al.*, 1998). Así, os cultivos en boas condicións terán un QY elevado, mentres que o QY dos cultivos estresados será menor.

3.9. Análise estatística

Para tódolos parámetros avaliados no estudo partiuse do cálculo das medias e desviacións estándar das tres réplicas realizadas con cada tratamento e co control. Os resultados expresáronse como porcentaxes de variación con respecto ao control, o que se lle asignou o valor do 100 %.

Para o tratamento estatístico dos datos utilizouse o programa IBM SPSS Statistic versión 22.0.0. Realizouse unha análise de varianza ANOVA de un factor, para determinar a existencia de diferenzas significativas e a proba post hoc de Dunnett, para comparar os resultados dos tratamentos fronte aos controis. Considerouse o p-valor < 0,05 como valor estatisticamente significativo.

As gráficas creáronse co paquete de análise estatística e de gráficas avanzadas SigmaPlot versión 12.0, e os resultados representáronse graficamente coa súa desviación estándar.

4. RESULTADOS E DISCUSIÓN

4.1. Propiedades inherentes e crecemento celular

Despois de 24 h de exposición aos distintos contaminantes xa se puideron observar alteracións nas propiedades inherentes celulares, así como no crecemento dos cultivos algais (Fig. 6).

O tamaño celular e a granularidade son características morfolóxicas que se ven influenciadas polas condicións de cultivo e a densidade celular (Umorin e Lind, 2005). No referente ao tamaño ou volume celular, todas as variacións documentadas resultaron estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (Fig. 6). Os cultivos crecidos en presenza de BP-3 e BPA mostraron un aumento na sinal de FS, e por conseguinte, un aumento do tamaño celular con respecto ao cultivo control. En estudos previos, como o de Seoane *et al.*, 2017b, con *Tetraselmis suecica* obtiveron outros resultados como resposta ao BP-3, onde para as concentracións ensaiadas, en concreto para a máis elevada (2 mg L^{-1}), pero inferior á utilizada neste estudo (5 mg L^{-1}), observaron unha diminución do tamaño celular, como resultado dun incremento da taxa de crecemento e da actividade metabólica, ao contrario do observado con *C. reinhardtii*, polo que poderíamos pensar que existe unha relación entre ditos parámetros, de xeito que as células aumentaron o seu tamaño, pero viron imposibilitada a finalización do seu ciclo celular. Outra posible explicación podería residir na formación de colonias palmeloides, inducidas por varios factores no xénero *Chlamydomonas* (Cid *et al.*, 1999), adoitando aparecer debido á incapacidade para rematar a división celular, así como por dificultades na regulación do volume como consecuencia de niveis elevados de radicais libres (Franqueira *et al.*, 2000). Por outro lado, os cultivos expostos a OTC e ATZ mostraron un lixeiro descenso da sinal, que se traduce nunha diminución do volume celular, o que pode deberse a unha inhibición do crecemento (Franqueira *et al.*, 2000) (Fig. 6).

A complexidade ou granularidade celular tamén resultou afectada (Fig. 6). En especial, observase un aumento da sinal SS, de novo, no cultivo tratado con BP-3, que duplicou o seu valor con respecto ao control. O cultivo tratado con BPA tamén experimentou un ascenso da sinal, sendo este tratamento e o citado anteriormente os que acadaron diferenzas significativas ($p < 0,05$). Este aumento na sinal SS podería ser consecuencia dun aumento dos niveis de estrés producidos pola exposición a ditos contaminantes (Prado *et al.*,

2012b). No caso dos cultivos con OTC e ATZ, alcanzaron valores máis próximos ao control (Fig. 6).

Como se sabe, ambos parámetros dependen da estabilidade da membrana, xa que alteracións nesta que afecten ao balance osmótico, como por exemplo por consecuencia do estrés oxidativo, poden influír no volume celular, así como na complexidade intracelular, debido a degradación e desorganización dos orgánulos celulares (Prado *et al.*, 2011; Prado *et al.*, 2012b).

O crecemento celular medido pola taxa de crecemento, é un dos parámetros máis utilizados nas probas de toxicidade (Franqueira *et al.*, 2000). Representa unha resposta sensible e de fácil seguimento, podendo traducirse a súa diminución como un indicador de estrés (Martínez-Jerónimo, 2008). En comparación cos anteriores, foi este parámetro o que experimentou as variacións máis grandes na totalidade dos compostos analizados. Todos os datos resultaron estatisticamente significativos ($p < 0,05$), observándose o descenso máis acusado no cultivo tratado con BP-3, que veu minguado o seu crecemento en máis dun 90 % (Fig. 6). Este impacto negativo de BP-3 sobre o crecemento tamén se puido observar en máis traballos nos que foi empregada a mesma especie (Mao *et al.*, 2017; Esperanza *et al.*, 2019), ademais doutros onde as especies de microalgas ensaiadas foron outras (Petersen *et al.*, 2014; Rodil *et al.*, 2009). O seguinte tratamento que causou un maior efecto inhibitorio para a división celular de *Chlamydomonas reinhardtii* foi a ATZ, cunha inhibición do crecemento de máis do 70 %. A mesma concentración subletal de ATZ empregada en estudos previos conduciu a uns resultados semellantes en cando a minoración deste parámetro (Esperanza *et al.*, 2015b; Esperanza *et al.*, 2016). BPA e OTC tamén reportaron un descenso da taxa de crecemento, roldando o 50 e o 35 % respectivamente (Fig. 6). O BPA tamén resultou tóxico para outras especies de fitoplancto, como *Alexandrium pacificum*, no cal concentracións moi inferiores a ensaiada neste estudo ($20 \mu\text{g L}^{-1}$ fronte aos 30mg L^{-1}), produciron unha diminución de ata o 40 % (M'Rabet *et al.*, 2018), mentres que para *Picocystis sp.*, unha microalga de natureza extremófila, ese nivel de inhibición acadouse con concentracións de BPA de 50 e 75mg L^{-1} (Ben Ouada *et al.*, 2018), moi superiores a analizada neste traballo.

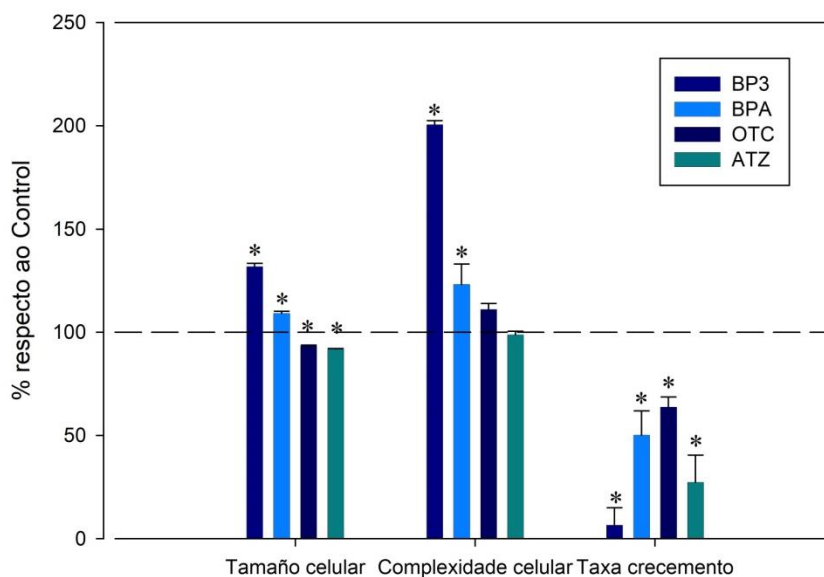


Figura 6. Variacións das propiedades inherentes celulares e da taxa de crecemento de *C. reinhardtii* exposta aos diferentes tratamentos, durante 24 h. Os resultados móstranse como porcentaxes da variación con respecto ao control (ao cal se lle asignou o valor de 100, representado pola liña discontinua). As diferenzas significativas con respecto ao control, cun nivel de significación do 0,05 ($p < 0,05$) están representadas por un asterisco (*).

4.2. Viabilidade e vitalidade celular e potencial de membrana

Unha vez finalizada a duración da experiencia, parámetros como a viabilidade e vitalidade celular e o potencial de membrana, relacionados co estado celular, víronse afectados pola exposición aos contaminantes ensaiados (Fig. 7).

O fluorocromo IP proporciona datos en torno a viabilidade celular, en función do estado da membrana plasmática. Varios estudos coinciden en que certos compostos tóxicos como o cobre ou determinados fármacos ou pesticidas poden ter efectos sobre a integridade da membrana plasmática, comprometendo deste xeito a viabilidade celular (Cid *et al.*, 1996b, Seoane *et al.*, 2017a; Prado *et al.*, 2009a). Neste estudo encontrámonos con que as diferenzas nos tratamentos con OTC e ATZ non foron significativas ($p > 0,05$), é dicir, a viabilidade das células non se viu mermada pola presenza destes contaminantes. Esta resposta coincide coa de traballos previos onde tamén se avaliaron os efectos destes dous contaminantes, Seoane *et al.*, 2014 e Esperanza *et al.*, 2015b, respectivamente, cuxa explicación podería radicar na estimulación de mecanismos de defensa antioxidantes e axustes metabólicos que permiten a supervivencia das células (Esperanza *et al.*, 2015b). Por outro lado, as diferenzas provocadas polos dous restantes contaminantes si foron significativas, resultando maior a causada polo BPA ($p < 0,05$) (Fig. 7). Como se mostra na

figura 8, a porcentaxe de células de *C. reinhardtii* con alteracións na membrana plasmática (PI +), despois de 24 h de exposición ao BPA, é maior cá porcentaxe obtida para o control, sendo esta diferenza estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

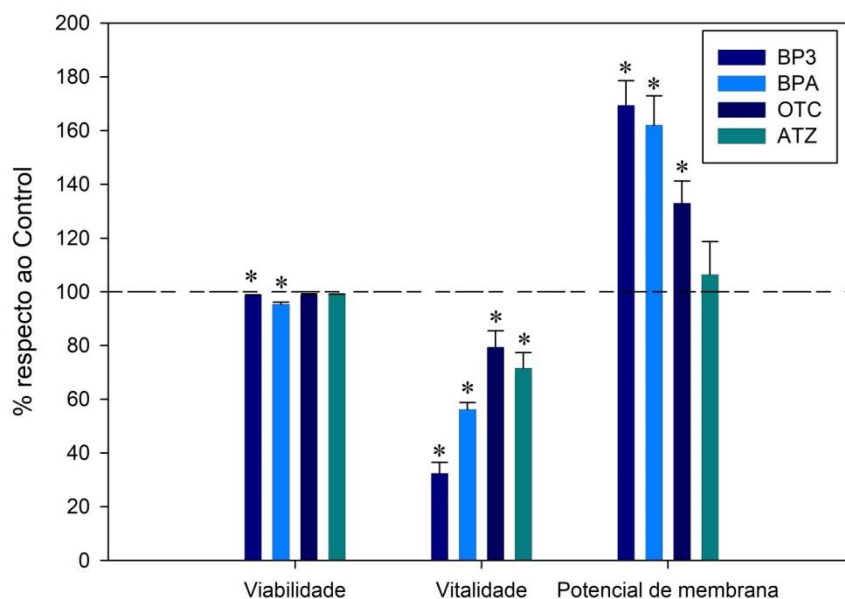


Figura 7. Variacións na viabilidade e vitalidade celular e no potencial de membrana de *C. reinhardtii* exposta aos diferentes tratamentos, durante 24 h. Os resultados móstranse como porcentaxes da variación con respecto ao control (ao cal se lle asignou o valor de 100, representado pola liña discontinua). As diferenzas significativas con respecto ao control, cun nivel de significacion do 0,05 ($p < 0,05$) están representadas por un asterisco (*).

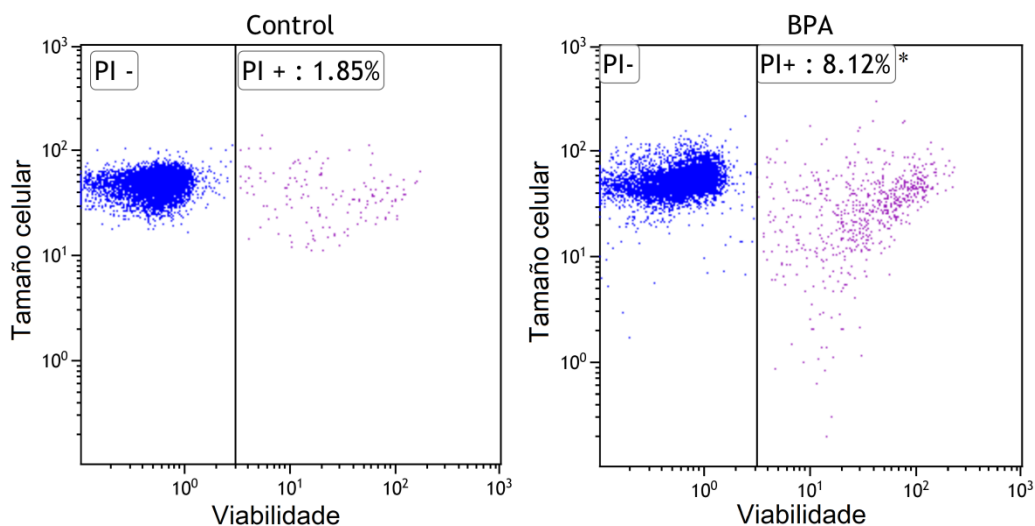


Figura 8. Viabilidade celular das células de *C. reinhardtii* en cultivos control e en cultivos expostos a BPA, durante 24 h. Proporcionáronse as porcentaxes de células non viables coa membrana non intacta (PI +). As diferenzas significativas con respecto ao control, cun nivel de significacion do 0,05 ($p < 0,05$) están representadas por un asterisco (*).

Para a medida da vitalidade celular ou actividade metabólica empregouse diacetato de fluoresceína (FDA). Este fluorocromo proporcionanos información acerca do vigor metabólico, en función da fluoresceína acumulada na célula, directamente proporcional a

actividade esterasa celular. Esta actividade metabólica está considerada como un indicador útil de estrés, cuxo descenso é signo da existencia de dita presión ambiental (Franklin *et al.*, 2001). Como se pode ver na figura 7, todos os tratamentos provocan un descenso significativo da actividade esterasa ($p < 0,05$), con respecto ao control. Na figura 9 móstrase unha comparación entre o cultivo control e o cultivo tratado con BP-3 que foi o que experimentou a maior perda de intensidade de fluorescencia, o que se traduce nunha actividade metabólica menor; así, pódese observar como a poboación de células metabolicamente activas (FDA+) aparece arrombada cara a esquerda con respecto a poboación control.

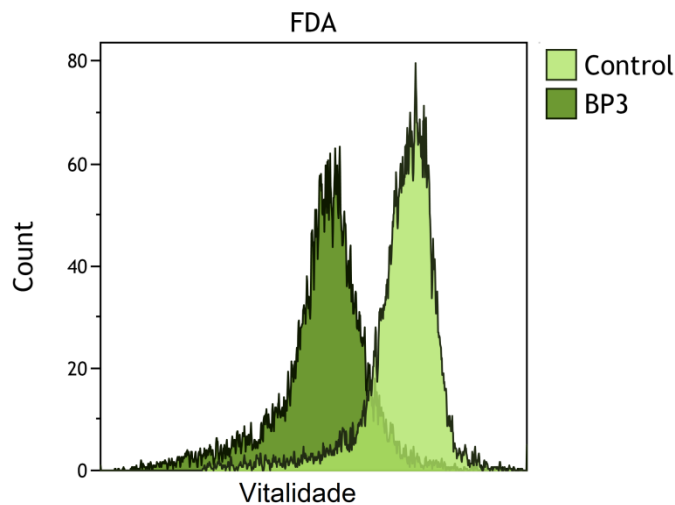


Figura 9. Histograma de citometría de fluxo que mostra a vitalidade celular ou actividade metabólica de células de *C. reinhardtii* en cultivos control e en cultivos expostos a BP-3 durante 24 h. Os datos que se representan correspóndense ás proporcións de células metabolicamente activas (FDA+).

Estudos previos tamén documentaron a redución desta actividade celular ante a presenza de BP-3 (Esperanza *et al.*, 2019) e ATZ (Esperanza *et al.*, 2015b) en *C. reinhardtii*, ou doutros contaminantes, como o herbicida paraquat (Prado *et al.*, 2009a; Prado *et al.*, 2011; Prado *et al.*, 2012b) noutra especie do xénero *Chlamydomonas* (*C. moewusii*). Sen embargo, a resposta á BP-3 noutra microalga (*T. suecica*), foi distinta, xa que se observou con concentracións inferiores á tratada neste estudo, un incremento da actividade metabólica, que pode ser interpretada como unha resposta do microorganismo cara a adaptación fisiolóxica ante novas condicións ambientais (Seoane *et al.*, 2017b). Este tipo de resposta tamén se dou en estudos con contaminación por metais como o cadmio ou o cobre (Jamers *et al.*, 2009; Lage *et al.*, 2001).

Dun ou doutro xeito, ambos fluorocromos, IP e FDA, proporcionan información acerca do estado da célula. Se ben é certo, que os resultados mostran unha maior redución da

fluorescencia de FDA con respecto á IP. Isto podería explicarse debido a que ambos procedementos son capaces de discernir entre células coa integridade da membrana intacta ou danada, pero no caso do FDA tamén inclúe como células non viables aquelas que teñen a membrana intacta pero sofren alteracións metabólicas que lle xeraron a redución ou anulación da actividade esterasa, polo que ditas células non emiten fluorescencia (Prado *et al.*, 2009a).

As distorsións no potencial de membrana citoplasmática están consideradas como respostas sensibles e rápidas ante cambios fisicoquímicos no ambiente extracelular (Lloyd *et al.*, 2004). Neste estudo a medición deste parámetro realizouse mediante a utilización do fluorocromo DiBAC₄(3), cuxos datos poñen de manifesto un aumento da fluorescencia en todos os tratamentos, con respecto ao control. A diferenza non resulta estatisticamente significativa para o cultivo tratado con ATZ ($p > 0,05$), ao contrario que para os tres restantes contaminantes ($p < 0,05$), sendo o BP-3, seguido do BPA e a OTC, o que alcanzou o valor máis elevado do conxunto, aumentando en case un 70 % por encima do valor control (Fig. 7). Este aumento da fluorescencia emitida polas células tradúcese como a despolarización das súas membranas citoplasmáticas. Na figura 10 móstrase como a porcentaxe de células despolarizadas (DiBAC +) aumenta nos cultivos tratados con BPA con respecto ao control. Estas variacións nos potenciais de membrana poderían estar vinculadas con alteracións ocasionadas pola acción dos radicais libres sobre os lípidos que conforman as membranas (Cid *et al.*, 1996b).

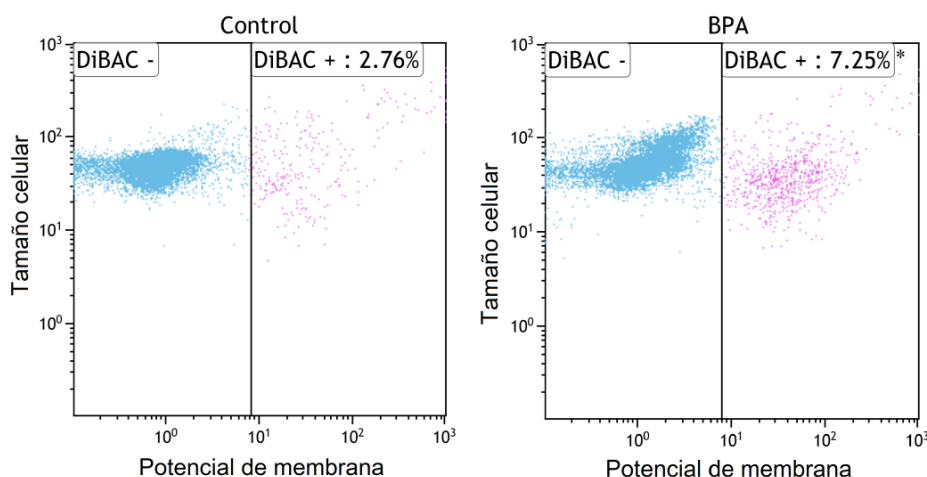


Figura 10. Potencial de membrana de células de *C. reinhardtii* en cultivos control e en cultivos expostos a BPA durante 24 h. Proporcionáronse as porcentaxes de células despolarizadas (DiBAC +). As diferenzas significativas con respecto ao control, cun nivel de significación do 0,05 ($p < 0,05$) están representadas por un asterisco (*).

4.3. Fluorescencia da clorofila *a* e PAM

Os organismos fototróficos como as microalgas presentan unha autofluorescencia natural debido aos pigmentos fotosintéticos que conteñen no seu interior, sendo das máis abundantes a clorofila *a* (Prado *et al.*, 2011). A fluorescencia da clorofila *a* bríndanos unha medida sensible dun proceso que forma parte da fotosíntese, fundamental para os organismos autótrofos, como o é a eficiencia da conversión de enerxía nos centros de reacción do fotosistema II (PSII) (Choi *et al.*, 2012). Este parámetro responde o estrés ambiental, onde podemos incluír tamén o estrés oxidativo (Drábková *et al.*, 2007).

As análises dos datos baseados na emisión fluorescente da clorofila *a* (FL4) mostran a existencia dos efectos provocados polos catro contaminantes ensaiados sobre este parámetro, obténdose un aumento significativo en todos eles ($p < 0,05$) (Fig. 11). A diferenza máis notable produciuna o BP-3, que experimentou un aumento do 150 % con respecto ao cultivo control (Fig. 11). Resultados semellantes con este mesmo composto foron reportados con anterioridade (Seoane *et al.*, 2017b, Esperanza *et al.*, 2019). Unha posible explicación radica na natureza do propio composto, que ten a capacidade de absorber a radiación ultravioleta e emitila de novo en forma de calor, provocando desta forma unha diminución na eficiencia fotosintética pola perda de enerxía (Seoane *et al.*, 2017b). Así, este aumento da autofluorescencia podería ter a súa orixe no bloqueo da cadea de transporte electrónica, a nivel do PSII (Cid *et al.*, 1995). O efecto contrario fronte a outros contaminantes como a eritromicina ou o paraquat tamén foi documentado (Sendra *et al.*, 2018; Prado *et al.*, 2011).

A modulación de amplitude de pulso (PAM) permite medir a variabilidade da fluorescencia da clorofila e o rendemento ou eficiencia fotosintética tanto en plantas terrestres como en microalgas (White *et al.*, 2011). No caso que nos concirne, para *C. reinhardtii*, o rendemento mantívose sen cambios significativos nos cultivos tratados con BPA e con ATZ, mentres que os tratados con BP-3 e OTC presentan un descenso na fluorescencia que resultou estatisticamente significativo en ambos casos ($p < 0,05$), sendo máis acusado o efecto producido por OTC, que provocou a redución da eficiencia fotosintética de *C. reinhardtii* en máis do 80 % con respecto ao grupo control (Fig. 11). O razoamento que nos leva a unha posible explicación deste drástica caída da eficiencia a causa da OTC baséase en que, aínda que as microalgas non son os organismos diana dos antibióticos, posúen orgánulos, tales como cloroplastos e mitocondrias, os cales se sabe

que tiveron un orixe procariota, polo que se convierten en fisioloxicamente susceptibles a estes compostos (Seoane *et al.*, 2014; Sendra *et al.*, 2018).

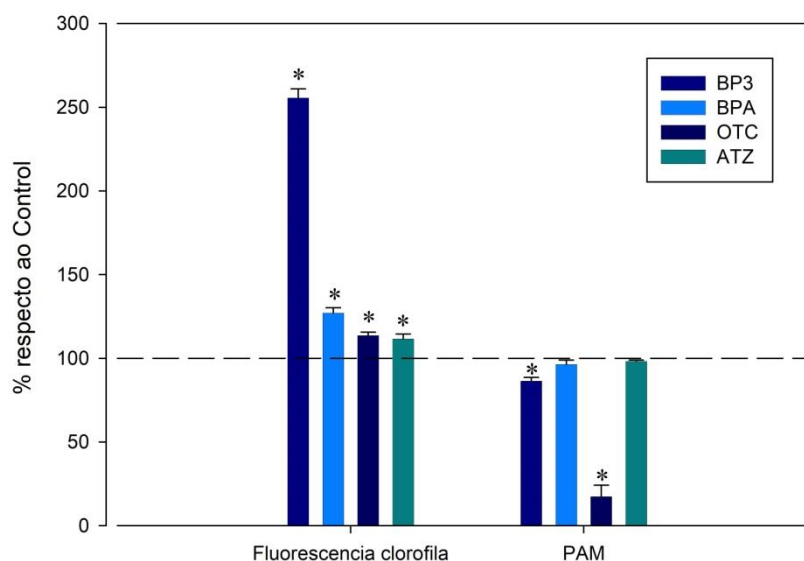


Figura 11. Variacións na fluorescencia da clorofila *a* e no rendemento fotosintético (PAM) de *C. reinhardtii* exposta aos diferentes tratamentos, durante 24 h. Os resultados móstranse como porcentaxes da variación con respecto ao control (ao cal se lle asignou o valor de 100, representado pola liña discontinua). As diferenzas significativas con respecto ao control, cun nivel de significación do 0,05 ($p < 0,05$) están representadas por un asterisco (*).

4.4. Estrés oxidativo

O estrés oxidativo está directamente relacionado coa produción de ROS. O exceso destes compostos no espazo intracelular pode ocasionar a peroxidación lipídica das membranas celulares (Ben Ouada *et al.*, 2018). Os resultados obtidos neste estudo, para a peroxidación lipídica, en referencia a produción de ROS, non acadaron diferenzas significativas con respecto ao control ($p > 0,05$), a excepción dos cultivos tratados con BP-3, que alcanzaron un valor de máis do 170 % con respecto ao control ($p < 0,05$) (Fig. 12). Este mesmo efecto tamén se puido observar noutros traballos con *C. reinhardtii*, como no de González-Pleiter *et al.*, 2017 ante o triclosán, cuxos danos na membrana celular debido a peroxidación foron demostrados a través da medida do Ca^{+2} intracelular, que acadou concentracións elevadas grazas a que a súa entrada nas células se veu favorecida polos danos causados na membrana citoplasmática.

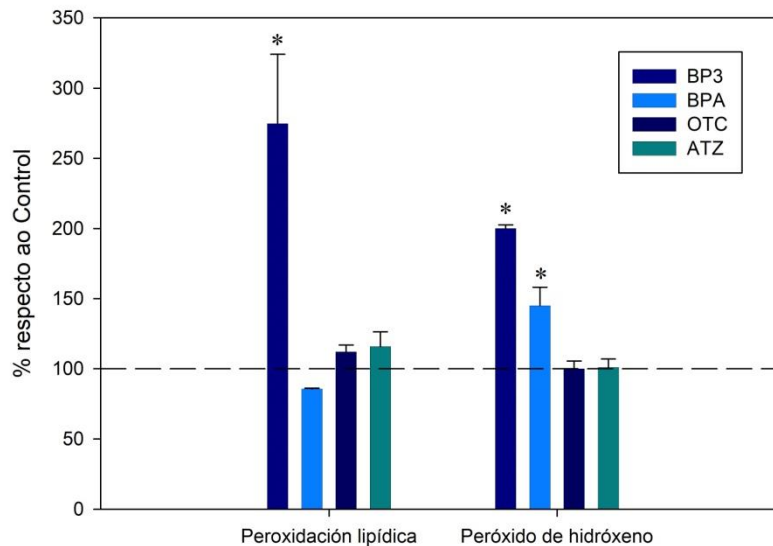


Figura 12. Variacións nos niveis de peroxidación lipídica e peróxido de hidróxeno de *C. reinhardtii* exposta aos diferentes tratamentos, durante 24 h. Os resultados móstranse como porcentaxes da variación con respecto ao control (ao cal se lle asignou o valor de 100, representado pola liña discontinua). As diferenzas significativas con respecto ao control, cun nivel de significación do 0,05 ($p < 0,05$) están representadas por un asterisco (*).

No caso dos niveis de estrés oxidativo medidos pola produción de peróxido de hidróxeno, os cultivos incubados con BP-3 e BPA sufriron un aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$), chegando a dobrar os niveis do cultivo control aqueles expostos a BP-3 (Fig. 12). Dedúcese que os mecanismos de defensa fronte ao estrés non conseguiron controlar a sobreprodución de ROS (Seoane *et al.*, 2017a), que podería estar relacionado ca diminución no rendemento fotosintético e a integridade da membrana celular indicados anteriormente. Na figura 13 represéntase a comparación entre a poboación control e a tratada con BP-3, onde se pode observar o desprazamento da curva debuxada polo BP-3 cara á dereita, con respecto a curva do control, o que suxire un aumento nos niveis de produción de peróxido de hidróxeno, e polo tanto do estrés oxidativo, no cultivo tratado. Os niveis mantivéronse constantes nos cultivos tratados con OTC e ATZ, ao contrario do que se podía esperar, xa que no caso da ATZ, son multitude de estudos ecotoxicolóxicos os que sinalan a produción de ROS en microalgas expostas a este herbicida (Esperanza *et al.*, 2016; Esperanza *et al.*, 2017, Qian *et al.*, 2009).

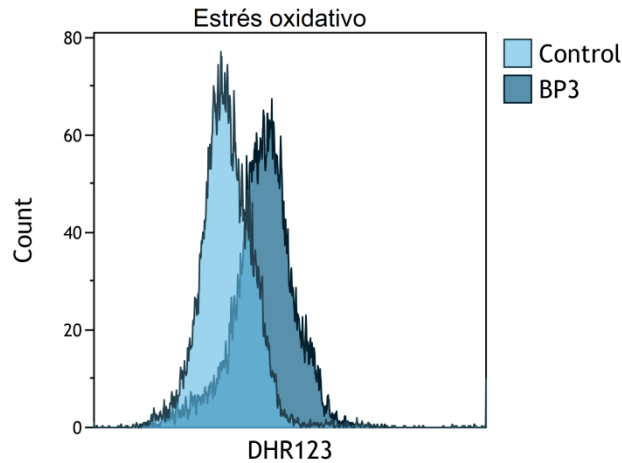


Figura 13. Histograma de citometría de fluxo que representa o estrés oxidativo como produción de peróxido de hidróxeno en células de *C. reinhardtii*, en cultivos control e en cultivos expostos a BP-3, tras 24 h. Os datos que se representan correspóndense á fluorescencia emitida polo fluorocromo DHR 123.

Táboa 1. Recompilación dos resultados acadados en cada un dos parámetros examinados, para cada composto, ás 24 h. As frechas ↑ e ↓ simbolizan o incremento ou diminución dos datos con respecto ao control.

	FS	SS	T.C.	IP	FDA	DiBAC ₄ (3)	FL4	PAM	P.L.	DHR 123
BP-3	↑↑	↑↑↑	↓↓↓↓	↓	↓↓↓↓	↑↑↑↑	↑↑↑ ↑	↓↓↓	↑↑↑	↑↑
BPA	↑	↑↑	↓↓	↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↑↑↑	↓↓	↓	↑
OTC	↓	↑	↓	=	↓	↑↑	↑↑	↓↓↓↓	↑	=
ATZ	↓↓	=	↓↓↓	=	↓↓	↑	↑	↓	↑↑	=

Os parámetros nos que se obtivo a mesma resposta celular son: taxa de crecemento (T.C.), vitalidade (FDA), potencial de membrana (DiBAC₄(3)), fluorescencia da clorofila *a* (FL4) e eficiencia fotosintética (PAM) (Táboa 1).

Os contaminantes que afectaron a tódolos parámetros ensaiados son: BP-3 e BPA (Táboa 1).

5. CONCLUSIONES

Chlamydomonas reinhardtii vese afectada a nivel fisiolóxico e morfolóxico pola presenza de tódolos contaminantes ensaiados (BP-3, BPA, OTC e ATZ). Aínda que os contaminantes ensaiados sexan de diferente natureza química, todos eles provocaron a mesma resposta de citotoxicidade nos seguintes parámetros: taxa de crecemento, vitalidade celular, potencial de membrana, fluorescencia da clorofila *a* e rendemento fotosintético.

Atendendo ós resultados obtidos, pódense facer dous grupos de contaminantes:

- O filtro solar BP-3 e o bisfenol A (BPA), que provocaron o mesmo patrón de resposta para todos os parámetros analizados, que se viron alterados en tódolos casos con respecto as células control sen contaminante.
- O antibiótico OTC e o herbicida ATZ, que induciron outro patrón de resposta moi similar entre eles, e non provocaron alteracións con respecto as células control no que respecta a viabilidade celular nin os niveis de ROS.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). Reseña Toxicológica de la Atrazina (en inglés) [Internet]. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública; 2003 [acceso 04 de xaneiro de 2020]. Disponible en: <http://www.atsdr/cdc.gov/es>
- Aguilera, C., Herrera, C., Ponce, J. (2010). Implementación, validación y aplicación de un nuevo método para la determinación de oxitetraciclina por HPLC en tejido muscular de salmonídeos. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 38: 227–233.
- Ben Ouada, S., Ben Ali, R., Leboulanger, C., Ben Ouada, H., Sayadi, S. (2018). Effect of Bisphenol A on the extremophilic microalgal strain *Picocystis sp. (Chlorophyta)* and its high BPA removal ability. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 158: 1–8.
- Bold, H., Wynne, M. (1985). *Introduction to the algae: structure and reproduction*. New Jersey: Prentice-Hall.
- Borgwardt, F., Robinson, L., Trauner, D., Teixeira, H., Nogueira, A.J.A., Lillebø, A.I., Piet, G., Kuemmerlen, M., O'Higgins, T., McDonald, H., Arevalo-Torres, J., Barbosa, A.L., Iglesias-Campos, A., Hein, T., Culhane, F. (2019). Exploring variability in environmental impact risk from human activities across aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 652: 1396–1408.
- Brana, C., Benham, C., Sundstrom, L. (2002). A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry. *Brain Res. Prot.* 10: 109–114
- 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.* XXX: 1–12.
- Chopra, I., Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of actions, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 232–260.
- Cid, Á., Herrero, C., Torres, E., Abalde, J. (1995). Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*: effects on photosynthesis and related parameters. *Aquat. Toxicol.* 31: 165–174.
- Cid, Á., 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.
- Cid, Á., Franqueira, D., Orosa, M., Torres, E. (1999). La citometría de flujo como herramienta para el estudio del efecto tóxico de diferentes contaminantes sobre microalgas. *Bioteología y aplicaciones de microorganismos pigmentados: IV Simposio científico en biología celular y molecular*. Pp. 41–55.
- Conde, K. Interacciones toxicológicas de dos microcontaminantes acuáticos emergentes, ibuprofeno y oxitetraciclina: evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad en la microalga modelo "*Chlamydomonas reinhardtii*" Dangeard [traballo fin de máster]. Universidade da Coruña; 2017.
- Crow, J.P. (1997). Dichlorodihydrofluorescein and Dihydrorhodamine 123 Are Sensitive Indicators of Peroxynitrite *in Vitro*: Implications for Intracellular Measurement of Reactive Nitrogen and Oxygen Species. *Nitric Oxide: Biol. Chem.* 1: 145–157.
- DeLorenzo, M.E., Scott, G.I., Ross, P.E. (2001). Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 84–98.
- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas.
- Drábková, M., Admiraal, W., Maršálek, B. (2007). Combined exposure to hydrogen peroxide and light - Selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms. *Environ. Sci. Technol.* 41: 309–314.

- DrugBank [base de datos en Internet]; 2007 [actualizado 02 de xaneiro de 2020; acceso 03 de xaneiro de 2020]. Disponible en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01428>
- Du, Y., Wang, W., Pei, Z., Ahmad, F., Xu, R., Zhang, Y., Sun, L. (2017). Acute toxicity and ecological risk assessment of in ultraviolet (UV)-filters. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 14: 1–15.
- Ebele, A.J., Abou-Elwafa Abdallah, M., Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerg. Cont.* 3: 1–16.
- Ersan, S., Bakir, S., Ersan, E.E., Dogan, O. (2006). Examination of free radical metabolism and antioxidant defence system elements in patients with obsessive–compulsive disorder. *Progr Neuro-Psychopharmac Biol Psych*. 30: 1039–1042.
- Esperanza, M., Cid, Á., Herrero, C., Rioboo, C. (2015a). 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, A. (2015b). *Chlamydomonas reinhardtii* cells adjust the metabolism to maintain viability in response to atrazine stress. *Aquat. Toxicol.* 165: 64–72.
- Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A. (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.
- Esperanza, M., Houde, M., Seoane, M., Cid, A., Rioboo, C. (2017). Does a short-term exposure to atrazine provoke cellular senescence in *Chlamydomonas reinhardtii*? *Aquat. Toxicol.* 189: 184–193.
- Esperanza, M. Toxicidad ejercida por contaminantes acuáticos sobre microalgas de agua dulce [tesis doctoral]. Universidade da Coruña; 2017.
- Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. (2019). Differential toxicity of the UV-filters BP-3 and BP-4 in *Chlamydomonas reinhardtii*: A flow cytometric approach. *Sci. Total Environ.* 669: 412–420.
- Fernández-Naveira, Á., 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.
- 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.
- Franqueira, D., Orosa, M., Torres, E., Herrero, C., Cid, Á. (2000). Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. *Sci. Total Environ.* 247: 119–126.
- García-Gómez, C., Gortáres-Moroyoqui, P., Drogui, P. (2011). Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción. *Quím. Viva*. 10: 96–105.
- Garrido, M., Cecchi, P., Vaquer, A., Pasqualini, V. (2013). Effects of sample conservation on assessments of the photosynthetic efficiency of phytoplankton using PAM fluorometry. *Deep-Sea Res. I*. 71: 38–48.
- Geueke, B. Dossier: Bisphenol A. [Internet]. The Food Packaging Forum; 2014 [acceso 03 de xaneiro de 2020]. Disponible en: https://www.foodpackagingforum.org/fpf-2016/wp-content/uploads/2015/11/FPF_Dossier01_BPA_ohne-Blase.pdf
- Gil, M.J., Soto, A.M., Usma, J.I., Gutiérrez, O.D. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia*. 7: 52–73.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L.F.C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 65: 45–80.

- 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, DS., Levine, RP. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci.* 54: 1665-1669.
- Guillen, D., Ginebreda, A., Farre, M., Darbra, R.M., Petrovic, M., Gros, M., Barcelo, D. (2012). Prioritization of chemicals in the aquatic environment based on risk assessment: analytical, modeling and regulatory perspective. *Sci. Total Environ.* 44: 236–252.
- Harris, E.H. (1989). *The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use.* San Diego: Academic Press.
- Harris, E.H. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 363–406.
- Harris, EH. (2009). *The Chlamydomonas Sourcebook.* Oxford: Academic Press.
- Heath, R.L., Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: i. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 189–198.
- Hummel, E., Guttman, P., Werner, S., Tarek, B., Schneider, G., Kunz, M. (2012). 3D Ultrastructural Organization of Whole *Chlamydomonas reinhardtii* Cells Studied by Nanoscale Soft X-Ray Tomography. *PLoS ONE* 7 (12): e53293.
- Humphreys, M.J., Allman, R. and Lloyd, D. (1994) Determination of the viability of *Trichomonas vaginalis* using flow cytometry. *Cytometry* 15: 343–348.
- Huo, W., Cai, P., Chen, M., Li, H., Tang, J., Xu, C., Zhu, D., Tang, W., Xia, Y. (2016). The relationship between prenatal exposure to BP-3 and Hirschsprung's disease. *Chemosphere.* 144: 1091–1097.
- Jamers, A., Lenjou, M., Deraedt, P., Van Bockstaele, Blust, D. R., de Coen, W. (2009) Flow cytometric analysis of the cadmium-exposed green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlorophyceae*), *Eur J Phycol.* 44:541–550.
- Jeanneret, R., Contino, M., Polin, M. (2016). A brief introduction to the model microswimmer *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur Phys J Spec Top.* 225: 2141–2156.
- 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.
- Juan-García, A., Gallego, C., Font, G. (2015). Toxicidad del Bisfenol A: Revisión. *Rev. Toxicol.* 32: 144–160.
- Krishan, A., Ganapathi, R.N., Israel, M. (1978). Effect of Adriamycin and analogs on the nuclear fluorescence of propidium iodide-stained cells. *Cancer Res.* 38: 3656–3662.
- Kromkamp, J., Barranguet, C., Peene, J. (1998). Determination of microphytobenthos PSII quantum efficiency and photosynthetic activity by means of variable chlorophyll fluorescence. *Mar Ecol Prog Ser.* 162: 45–55.
- 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.
- Lago, M., Boteler, B., Rouillard, J., Abhold, K., Jähnig, S.C., Iglesias-Campos, A., Delacámara, G., Piet, G.J., Hein, T., Nogueira, A.J.A., *et al.* (2019). Introducing the H2020 AQUACROSS project: Knowledge, Assessment, and Management for AQUATIC Biodiversity and Ecosystem Services aCROSS EU policies. *Sci. Total Environ.* 652: 320–329.
- Lam, P.K.S., Gray, J.S. (2003). The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar. Pollut. Bull.* 46: 182–186.

- 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.
- 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.
- Mao, F., He, Y., Kushmaro, A., Gin, K.Y-H. (2017). Effects of benzophenone-3 on the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquat. Toxicol.* 193:1–8.
- Martínez-Jerónimo F. F. (2008). Ensayo de toxicidad crónica con microalgas clorofíceas. Pp. 89–98 in *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México* (P. Ramírez Romero y A. Mendoza Cantú Compiladoras). Instituto Nacional de Ecología, Semarnat.
- 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.
- M'Rabet, C., Pringault, O., Zmerli-Triki, H., Gharbia, H. B., Couet, D., Yahia, O. K-D. (2018). Impact of two plastic-derived chemicals, the Bisphenol A and the di-2-ethylhexyl phthalate, exposure on the marine toxic dinoflagellate *Alexandrium pacificum*. *Mar. Pollut. Bull.* 126: 241–249.
- Petersen, K., Heiaas, H.H., Tollefsen, K.E. (2014). Combined effects of pharmaceuticals, personal care products, biocides and organic contaminants on the growth of *Skeletonema pseudocostatum*. *Aquat. Toxicol.* 150: 45–54.
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Abalde, J., Cid, Á. (2009). Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat. *Environ Int.* 35: 240–247.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. (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., Suárez-Bregua, P., Cid, Á. (2012a). Flowcytometric analysis to evaluate physiological alterations in herbicide-exposed *Chlamydomonas moewusii* cells. *Ecotoxicology*. 21: 409–420.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. (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, Á. (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., 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.
- Rodil, R., Moeder, M., Altenburger, R., Schmitt-Jansen, M. (2009). Photostability and phytotoxicity of selected sunscreen agents and their degradation mixtures in water. *Anal. Bioanal. Chem.* 395: 1513–1524.
- Ross, D. D., Joneckis, C. C., Ordóñez, J. V., Sisk, A. M., Wu, R. K., Hamburger, A. W. (1989). Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell number. *Cancer Res.* 49: 3776–3782.
- Rutherford, A.W., Krieger-Liszkay, A. (2001). Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends Biochem. Sci.* 6: 648–653.
- Sánchez-Avila, J., Tauler, R., Lacorte, S. (2012). Organic micropollutants in coastal waters from NW Mediterranean Sea: Sources distribution and potential risk. *Environ. Intern.* 46: 50–62.
- Sasso, S., Stibor, H., Mittag, M., Grossman, A.R. (2018). From molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature. *eLife*. 7: e39233.

- Shapiro, H.M. (1995). Practical Flow Cytometry. New York: Willey-Lyss Inc.
- Sendra, M., Moreno-Garrido, I., Blasco, J., Araújo, C.V.M. (2018). Effect of erythromycin and modulating effect of CeO₂ NPs on the toxicity exerted by the antibiotic on the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Phaeodactylum tricorutum*. Environ. Pollut. 242: 357–366.
- 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. Mar. Environ. Res. 101: 1–7.
- Seoane, M., Esperanza, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. (2017^a). Flow cytometric assay to assess short-term effects of personal care products on the marine microalga *Tetraselmis suecica*. Chemosphere. 171: 339–347.
- Seoane, M., Esperanza, M., Cid, Á., (2017^b). Cytotoxic effects of the proton pump inhibitor omeprazole on the non-target marine microalga *Tetraselmis suecica*. Aquat. Toxicol. 191. 62–72.
- Umorin, M., Lind, O. (2005) Cell volume distribution dynamics of *Chlorella vulgaris* Beij. in batch cultures under continuous light. Biotechnol Lett, 27: 347-354.
- Villeneuve, A., Larroudé, S. & Humbert, J.F. (2011). Herbicide contamination of fresh-water ecosystems: impact on microbial communities, Pesticides – Formulations, Effects, Fate. InTech Open. Pp. 285–312.
- Wei, T., Chen, C., Hou, J., Xin, W., Mori, A. (2000). Nitric oxide induces oxidative stress and apoptosis in neuronal cells. Biochim. Biophysic Acta 1498: 72–79.
- White, S., Anandraj, A., Bux, F. (2011). PAM fluorometry as a tool to assess microalgal nutrient stress and monitorcellular neutral lipids. Biores. Technol. 102:1675–1682.
- Wolff, C., Fuks, B., Chatelain, P. (2003). Comparative study of membrane potential sensitive fluorescent probes and their use in ion channel screening assays. J. Biomol. Screen. 8: 533–543.
- Yazdani, M. (2015). Concerns in the application of fluorescent probes DCDHF-DA, DHR 123and DHE to measure reactive oxygen species in vitro. Toxicol in Vitro. 30: 578–582.