



TESIS DOCTORAL

*Desarrollo de bioensayos y biomarcadores para la
evaluación del estrés abiótico y la toxicidad ambiental*

Autora:

María Rosa de las Heras González

Directora:

Myriam Catalá Rodríguez

Programa del Doctorado en Ciencias: Ecología y Biodiversidad

Escuela Internacional de Doctorado

2022

Es difícil empezar con los agradecimientos. El camino ha sido muy duro, lleno de muchos impedimentos y muchas veces ha sido difícil seguir adelante.

Agradezco a mi tutora haberme dado la oportunidad de llegar hasta aquí cuando mi situación no era la mejor. Agradezco su paciencia y dedicación.

A Joana, Irene y Paula mis compañeras en el laboratorio y mis amigas. Ellas me apoyaron en todo momento y me ayudaron con las dificultades que se iban presentando. A todas aquellas personas que he conocido estos años en el despacho y en el laboratorio, agradezco su amabilidad, su alegría y las ganas que siempre han tenido de ayudarme.

Mis amigas también han sido una parte importante, apoyándome en cada momento, escuchándome en los momentos difíciles y dispuestas a colaborar para que lo consiguiera. Mi familia nunca ha dejado de creer en mí, lo cual me ha dado muchas fuerzas para seguir adelante. Sin duda, todo lo que he conseguido, se lo debo a ellos. Se han esforzado porque yo persiguiera mis sueños, aunque para ellos fuera muy complicado.

Muchas gracias a todos.

“La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Pero ¡Qué importa! Hay que perseverar y sobre todo tener confianza en uno mismo” Madame Curie

Tabla de contenidos

<i>Acrónimos</i>	6
<i>Resumen</i>	8
<i>Lista de manuscritos</i>	13
<i>Filiación de autores</i>	13
Introducción General.....	14
<i>Objetivos</i>	28
CAPITULO 1.....	30
CAPITULO 2.....	68
CAPITULO 3.....	86
Discusión General.....	108
Conclusiones.....	122

Acrónimos

BHT: 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol

CGMs: Modelos de circulación atmosférica oceánica

DCFH-DA₂: Diacetato de diclorodihidrofluoresceína

DCF: Diclorofluoresceína

DMA: Directiva Marco del Agua

LOEC: Concentración más Baja de Efecto Observado

MDA: Malondialdehído

NOEC: Concentración Sin Efecto Observado

PNR Plan Nacional de Regadíos de España

POPs: Contaminantes Orgánicos Persistentes

ROS: Especies reactivas de oxígeno

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico

TEP: 1,1,3,3-tetrametoxipropano

Resumen

Las actividades humanas producen una alteración en los ecosistemas a través de los cambios en las comunidades, la fragmentación de los hábitats y la contaminación química. En los últimos años ha aumentado de manera creciente la preocupación mundial sobre la presencia de contaminantes emergentes puesto que las tecnologías utilizadas actualmente no consiguen eliminarlas de manera completa. Los contaminantes y sobre todo los microcontaminantes no tienen por qué causar letalidad en los organismos en concentraciones ambientales. Sin embargo, pueden tener efectos crónicos en los organismos, poniendo en riesgo la viabilidad de las poblaciones. En la evaluación de la contaminación ambiental se han utilizados diversas técnicas. Los análisis químicos nos permiten caracterizar los productos químicos en el medio, pero no determinan sus procesos de degradación ni la posible sinergia entre ellos. Tampoco tienen en cuenta la biodisponibilidad. La evaluación mediante bioindicadores puede llevar más tiempo y ser más costoso que hacer un seguimiento de los indicadores abióticos. Ambas herramientas tienen un carácter diagnóstico más que pronóstico del estado del ecosistema y no permiten anticiparse a daños irreversibles. Los bioensayos por otra parte sí permiten monitorizar la calidad ambiental, pero utilizan pocos taxones, obteniendo resultados poco relevantes y no extrapolables a otras especies similares, especialmente en el medio terrestre. Para que la protección del ecosistema sea total, se necesitan muchos ejemplares por lo que la duración y coste de estos estudios aumentan. Los biomarcadores son una herramienta útil para evaluar la contaminación y sus posibles efectos en la biota. Son cambios suborgánicos que se producen en un organismo, es decir a nivel bioquímico, celular, molecular o fisiológico y que son indicativos de la exposición y/o efecto de un contaminante. Medidos a nivel molecular/celular permiten su utilización de manera predictiva. La presente tesis doctoral pretende contribuir al desarrollo de herramientas de diagnóstico ambiental más sensibles, fiables, rápidas, de bajo coste y con carácter pronóstico. Una de estas herramientas es la evaluación del uso de biomarcadores de campo para detectar contaminantes persistentes en sedimentos y bioacumulativos en la biota. Con este objetivo, se seleccionaron diferentes puntos de muestreo, a lo largo de dos arroyos que atraviesan una zona agrícola de regadío. Se evaluaron los niveles de peroxidación lipídica en varios órganos de cangrejo de río americano (*Procambarus clarkii*) y en las hojas de dos especies leñosas de sauce y encina (*Salix spp* y *Quercus rotundifolia*). La determinación de los niveles de MDA (malonaldehído) mediante el ensayo de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico permitió medir los niveles de peroxidación lipídica. Se observaron diferencias en los niveles de peroxidación lipídica en individuos de *P.clarkii* recogidos en diferentes puntos de muestreo, sin embargo estas diferencias variaban según el órgano (si se tenían en cuenta también las variaciones debidas al sexo). Se comprobaron niveles de peroxidación lipídica en las branquias de los machos de cangrejo rojo americano aguas abajo de la zona de riego y en las hojas de encina recolectadas en una zona de drenaje de un campo de arroz. El índice MDA-branquias/MDA-hepatopáncreas permitió distinguir entre los sitios de referencia y los

contaminados. La peroxidación lipídica puede ser por tanto un biomarcador de campo adecuado para evaluación de la contaminación ambiental y permite gestionar de manera más eficiente la contaminación agrícola difusa. Otra herramienta sería el desarrollo de un microbioensayo rápido que pueda detectar contaminantes persistentes en aguas superficiales y aquellas formas de metales pesados que al liberarse al medio ambiente son muy tóxicas. Con el fin de desarrollar este microbioensayo, se cultivó el alga liquénica *Asterochloris erici* de forma axénica sobre papel de celulosa tratado químicamente, se deshidrató y se rehidrató con diferentes concentraciones de los contaminantes dicromato de potasio, sulfato de cobre, ácido bórico y ácido clofbrico. Se midió la autofluorescencia de la clorofila y el contenido de radicales libres 5 minutos después de la rehidratación. También se analizaron imágenes microscópicas de fluorescencia de los ficobiontes expuestos. Las concentraciones altas de dicromato de potasio y de sulfato de cobre disminuyeron la autofluorescencia de la clorofila, mientras que el ácido bórico y el ácido clofbrico tuvieron poco efecto. Los metales pesados indujeron estallidos de radicales libres en concentraciones extremadamente bajas mientras que el ácido bórico y el ácido clofbrico provocaron aumentos modestos y fluctuantes. En todos los casos, las LOEC de los radicales libres son menores que los de la autofluorescencia de la clorofila en al menos tres órdenes de magnitud, lo que hace que este microbioensayo sea altamente sensible y rápido, así como de bajo coste y ecológicamente relevante. Los ecosistemas terrestres están más representados gracias al uso de este microalga aéreo-terrestre. Y, por último, se desarrolló un estudio que analiza el potencial de la espectrometría de infrarrojo cercano con transformada de Fourier (FT-NIRS) como método alternativo para la detección de biomarcadores de estrés ambiental. Esta técnica permite el análisis del estado metabólico de las células, proporcionando una huella dactilar molecular única y permite asociar cambios metabólicos con situaciones de estrés. En particular, permite analizar en profundidad la estructura del agua y su papel en los sistemas biológicos constituyendo la novedosa acuafotómica. Para este análisis se curva de deshidratación de los ficobiontes y se obtuvieron los espectros NIRS de *Asterochloris erici* en el proceso de deshidratación en atmósfera de gel de sílice y tras la rehidratación. Se comprobó que los *A. erici* estabiliza su contenido relativo de agua en un 16 % después de 180 minutos. Al comparar el espectro de las algas frescas con las algas deshidratadas, éstas últimas tenían mayor absorbancia de lípidos saturados y proteínas. Por otro lado, las algas rehidratadas durante 24 horas con agua desionizada no mostraban muchas diferencias con respecto a las algas frescas, pero había mayor absorción de aminos y proteínas. No encontramos diferencias apreciables entre los espectros de algas frescas y rehidratadas tras 48 horas en la huella molecular global. Mediante acuafotómica se estudiaron seis especies moleculares de agua: cúmulos catiónicos (S_r , 1346 nm), agua libre (S_0 , 1403 nm), agua con un enlace de hidrógeno (S_1 , 1440 nm), dos (S_2 , 1464 nm), tres (S_3 , 1490 nm) y cuatro (S_4 , 1650 nm). Según avanza la deshidratación, disminuyen las moléculas de agua libre y aumentan las moléculas con puentes de hidrogeno. Un descenso brusco de S_0 a los 100 minutos y el aumento de S_1 parecen indicar la preparación para la anhidrobiosis. La absorbancia relativa de estas especies en la deshidratación en atmosfera cerrada es diferente a la que aparece en la liofilización. El estudio de las moléculas de agua nos facilita comprender los mecanismos de tolerancia a la deshidratación

Lista de manuscritos

Esta tesis se basa en tres manuscritos redactados para su publicación en revistas científicas internacionales. A continuación, se especifican el título, los autores que participaron y el estado actual de publicación de cada manuscrito:

Capítulo 1: Analysis of lipid peroxidation in animal and plant tissues as field-based biomarker in Mediterranean irrigated agroecosystems (Extremadura, Spain). Rosa De Las Heras, José Luis Rodríguez-Gil, Jon San Sebastián Sauto, Paz Sánchez Sánchez, and Myriam Catalá. *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH, PART B* 2018, VOL. 0, NO. 0, 1–13.

Capítulo 2: Biotechnological applications of lichen phycobionts: fast bioassays of environmental toxicity. Rosa de las Heras, Myriam Catalá. *SYMBIOSIS* 82, 69–78(2020).

Capítulo 3: Análisis metabolómico de la huella molecular global en el infrarojo cercano (NIRS) de la deshidratación-rehidratación de la microalga simbiótica *Asterochloris erici* y aquafotómica. Manuscrito en preparación.

Filiación de autores

Rosa de las Heras:

- Área de Biodiversidad y Conservación, Depto. de Biología, Geología, Física y Química Inorgánica, ESCET, Universidad Rey Juan Carlos, C/ Tulipán s/n, 28933, Móstoles, Spain.

Myriam Catalá (directora y tutora de la tesis):

- Área de Biodiversidad y Conservación, Depto. de Biología, Geología, Física y Química Inorgánica, ESCET, Universidad Rey Juan Carlos, C/ Tulipán s/n, 28933, Móstoles, Spain.

José Luis Rodríguez-Gil (capítulo 1):

-Departamento de Biología, Universidad de Ottawa, Ottawa, Ontario, K1N 6N5, Canadá.-
Department of Environment and Geography, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, R3T 2N2, Canada.

Jon San Sebastián Sauto (capítulo 1):

-Departamento de Estudios y Consultoría, Área de Ingeniería y Edificación, Tragsatec, Madrid, España.

Paz Sánchez Sánchez (capítulo 1):

-Departamento de Estudios y Consultoría, Área de Ingeniería y Edificación, Tragsatec, Madrid, España.

Introducción General

1. Necesidad de desarrollar nuevas herramientas en la evaluación de la contaminación ambiental

Las actividades humanas producen una alteración en los ecosistemas a través de los cambios en las comunidades, la fragmentación de los hábitats y la contaminación química (Daughton and Ternes 1999). Existen más de 67 millones de sustancias orgánicas e inorgánicas conocidas, por lo que aparecen grandes retos en la evaluación y en el seguimiento de la contaminación química. En los últimos años ha aumentado de manera creciente la preocupación mundial sobre la presencia de contaminantes emergentes en el medio acuático. Entre estas sustancias se encuentran los productos farmacéuticos, los productos de cuidado personal, las hormonas esteroideas, los productos químicos industriales y los pesticidas (Luo et al. 2014). Las tecnologías habituales no consiguen eliminar de manera completa estos contaminantes. Incluso se consideran las aguas residuales como una de las principales fuentes puntuales de microcontaminantes (Barcelo and Petrovic 2008; EEA 2011).

Los contaminantes y sobre todo los microcontaminantes no tienen por qué causar letalidad en los organismos en concentraciones ambientales. Sin embargo, estos contaminantes pueden tener efectos crónicos como pueden ser alteraciones en el crecimiento, deformaciones anatómicas, cambios en la proporción de sexos o en su ciclo vital (Jjemba 2006). Estos cambios impiden el funcionamiento normal de las poblaciones silvestres en términos biológicos, lo que los podría llevar a la extinción. Actualmente, se necesita mejorar la capacidad de cuantificación de los contaminantes y sus productos de transformación (cuyas concentraciones están en el rango de ng/L) así como su identificación inequívoca, teniendo en cuenta que no existen casi referentes estandarizados (Dévier et al. 2011).

No hay directrices ni normas de vertido para la mayor parte de microcontaminantes, incluso existen sustancias no reguladas como, por ejemplo, los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs) y las hormonas esteroideas. Para establecer los límites reglamentarios de estos contaminantes es importante profundizar en la respuesta biológica a estos compuestos, conociendo no solo su impacto sino también sus efectos sinérgicos, aditivos y antagónicos (Luo et al. 2014) y realizando un seguimiento de los mismos en el agua, sedimentos y biota (Damásio et al. 2007). De hecho, la actual legislación de la Unión Europea, como el Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas (REACH) y la Directiva Marco del Agua (DMA) promueven mejorar las herramientas disponibles actualmente, convirtiéndolas en más fiables y con capacidad de predecir los efectos de las sustancias químicas, siendo herramientas sensibles y con capacidad retrospectiva para analizar la calidad de las aguas (Connon et al. 2012).

1.1. Herramientas de evaluación ambiental que no permiten predecir alteraciones en la salud del ecosistema

Los análisis químicos nos permiten caracterizar los productos químicos en el medio, pero no determinan sus procesos de degradación ni la posible sinergia entre ellos (Sanderson

et al. 2004; Glassmeyer et al. 2008). La eliminación de un compuesto no implica detoxificación, ya que pueden surgir metabolitos o compuestos de descomposición más perjudiciales. En las aguas residuales se reúnen y acumulan multitud de sustancias que constituyen mezclas complejas, así como consorcios microbianos (Pedrazzani et al. 2019). Sin embargo, se considera que el riesgo global puede ser debido a unos pocos componentes de estas mezclas (Price et al. 2012; Backhaus and Karlsson 2014; Altenburger et al. 2015; Hashmi et al. 2018). Para evaluar de manera realista el riesgo que suponen los componentes biológicamente activos en las mezclas complejas se necesitan conocer los efectos biológicos que se producen a estas concentraciones ambientales (Eggen and Segner 2003; Escher, B.I.; Leusch 2012).

En los ecosistemas, la toxicidad no es estática, algo que debe ser contemplado para poder entender la biodisponibilidad de los contaminantes en la biota (Munawar, 1987), la cual difiere entre organismos e incluso entre especies (Reid et al. 2000). Por lo que, estos análisis no nos permiten anticiparnos a daños irreversibles en el ecosistema, teniendo muy baja capacidad de predicción (Rodríguez-Gil et al, 2013).

Para analizar la calidad medio ambiental y su evolución en el tiempo, se utilizan bioindicadores, los cuales incluyen procesos biológicos, especies o comunidades. Los cambios en el medio ambiente pueden ser debidos a perturbaciones antropogénicas o a factores de estrés natural siendo las perturbaciones antropogénicas el primer foco en las investigaciones con bioindicadores. Los bioindicadores tienen una tolerancia moderada a la variabilidad ambiental, lo cual les otorga sensibilidad, y reflejan la respuesta biótica general (Holt and Miller 2011).

El uso de bioindicadores tiene una serie de ventajas respecto a los análisis químicos. En primer lugar, añade un componente temporal al tiempo de vida o de residencia de un organismo, lo que permite incorporar condiciones ambientales del pasado, presente y futuro. Además, los bioindicadores pueden ser muy sensibles a concentraciones extremadamente bajas. Y, por último, pueden indicar efectos indirectos de los contaminantes. Sin embargo, no permiten diferenciar entre la variabilidad natural y la debida al impacto humano. Además, los bioindicadores pueden estar afectados por factores que no tienen que ver con estrés o perturbación. Su uso también depende de la escala, por ejemplo, el uso de bioindicadores de vertebrados puede no servir para explicar la biodiversidad local de una comunidad de insectos. Por otro lado, al utilizar bioindicadores concretos con requisitos de hábitat determinados no se puede proteger a especies infrecuentes con requisitos distintos. Por último, para evaluar la calidad ambiental a lo largo del tiempo se utilizan un pequeño grupo de especies no reflejando la complejidad del sistema (Holt and Miller 2011). Para una gestión del ecosistema correcta se debería conocer previamente las condiciones abióticas. Analizar los bioindicadores puede llevar más tiempo y ser por tanto más costoso que hacer un seguimiento de los indicadores abióticos (Lorenz 2003). Al igual que los análisis químicos, su uso proporciona un carácter diagnóstico del estado del ecosistema y no nos permite anticiparnos a daños irreversibles en el mismo.

1.2. Herramientas de evaluación ambiental que permiten predecir alteraciones en la salud del ecosistema

- El uso de biomarcadores permite establecer estrategias de anticipación al daño ambiental

El término “biomarcador” o “marcador biológico” ha sido utilizado por la medicina de manera objetiva como un signo del estado de salud del paciente, el cual puede ser medido de manera precisa y reproducible. Existe un poco de confusión respecto a la definición de biomarcador. El Comité de Marcadores Biológicos del Consejo Nacional de Investigación (NRC) estableció su definición de biomarcador como “indicadores que señalan eventos en sistemas biológicos o muestras tras la exposición química” y propuso el uso de marcadores biológicos para determinar la concentración activa biológicamente, los efectos adversos y la población o individuos susceptibles, especialmente para prevenir enfermedades clínicas en humanos (NCR 1987). Adams (1990) modificó la definición para incluir características de los organismos, poblaciones o comunidades que responden de manera cuantificable a las alteraciones medioambientales. Depledge (Depledge et al. 1993; Depledge 1994) añadió también respuestas de comportamiento y otras perspectivas como la latencia y la diversidad genética. Lam (2009) lo limita a los cambios suborgánicos que se producen en un organismo, es decir a nivel celular, bioquímico, molecular o fisiológico y que son indicativos de la exposición y/o efecto de un xenobiótico. En las evaluaciones del riesgo medioambiental, la OMS incluye en la definición de los biomarcadores "casi cualquier medición que refleje una interacción entre un sistema biológico y un peligro potencial, que puede ser químico, físico o biológico. La respuesta medida puede ser funcional y fisiológica, bioquímica a nivel celular o una interacción molecular (WHO, 2003)".

La primera interacción entre las sustancias químicas y los organismos se produce en la superficie de las células. Estas alteraciones celulares podrían influir en el desarrollo, el crecimiento y la reproducción de una población (Fent 2004), por lo que los biomarcadores medidos a nivel celular/molecular permiten anticiparse a otros niveles de organización, como son las poblaciones, las comunidades y los ecosistemas (Lam 2009). Estos biomarcadores de “alerta temprana” permiten su utilización de manera predictiva, permitiendo aplicar estrategias antes de que el daño medio ambiental sea irreversible (Cajaraville et al. 2000).

A diferencia de los análisis químicos, los biomarcadores permiten evaluar los efectos biológicos de las mezclas químicas y discrimina entre los efectos de los contaminantes y los efectos de otros factores abióticos (Amiard, JC; Amiard-Triquet 2015). Los biomarcadores nos confirman la biodisponibilidad en la biota (Bucheli and Fent 1995). Los biomarcadores pueden ser divididos en tres clases según (NCR, 1987, WHO, 1993):

-Biomarcadores de exposición: Consisten en la detección y medición de una sustancia exógena o su metabolito o el producto de la interacción entre un xenobiótico y alguna célula o molécula objetivo, realizándose la medición en el interior del propio organismo.

-Biomarcadores de efecto: Incluye la medición de alteraciones bioquímicas o fisiológicas que se producen en los tejidos o fluidos de un organismo, relacionados con un deterioro o enfermedad.

-Biomarcadores de susceptibilidad: Corresponden a la capacidad inherente o adquirida de responder a la exposición de un xenobiótico, incluyendo factores genéticos o cambios en los receptores que alteran la susceptibilidad del organismo a la exposición.

A medida que se avanza en la identificación y caracterización de más biomarcadores se comprueba que los biomarcadores pueden tener distintas capacidades por lo que puede haber solapamiento en la definición de la clase a la que pertenece (Schlenk 1999). Por otro lado, la elección de un biomarcador se realiza en función de un proceso biológico conocido (Tabla 1). Estas mediciones permiten identificar contaminación química y su efecto en las especies expuestas y ayuda en las evaluaciones de la calidad medioambiental (Vasseur and Cossu-Leguille, 2003).

Tabla 1: Ejemplo de algunos de los biomarcadores más habitualmente utilizados identificativos de toxicidad. Estas mediciones realizadas a nivel individual se agrupan en función de la respuesta frente a la contaminación (adaptada de Hampel et al., 2016; Kroon et al., 2017; Vasseur and Cossu-Leguille, 2003).

Grupo de biomarcadores	Ejemplos	Respuesta analizada	Clase de polutantes
Metalotioneínas	Síntesis de metalotioneínas	Efecto protector frente al estrés oxidativo	Metales
Enzimas de Biotransformación (Fase I)	Citocromo P450 1A1 (CYP1A1) y actividad enzimática de la etoxiresoufinodetilsa (EROD)	Reacciones de metabolización de un compuesto	Contaminantes orgánicos (hidrocarburos aromáticos, bifenilos policlorados o dioxinas)
Enzimas de Biotransformación (Fase II)	Glutación-S-transferasa		Amplia variedad de xenobióticos (Compuestos electrofílicos)
Proteínas de estrés	Proteínas de choque térmico	Proteger y regenerar las células	Metales y otros xenobióticos
Parámetros Neurotóxicos	Actividad de la acetilcolinesterasa (AChE)	Alteraciones en la capacidad de transmitir impulsos nerviosos	Insecticidas organofosforados e insecticidas de carbamato
Parámetros de Estrés Oxidativo	Actividad de glutación peroxidasa (GPX) y enzimas relacionadas (por ejemplo, las especies reactivas de oxígeno y la actividad catalasa)	Cambios en el estatus redox del organismo y en la actividad de las especies reactivas del oxígeno	Xenobióticos orgánicos no específicos

Existen determinados contaminantes que, por su naturaleza, no pueden ser detectados fácilmente. Llegan a ser sustancias persistentes que se acumulan en los sedimentos. También se pueden acumular en los tejidos de los organismos cuando son liberadas al medio acuático (Tosti 2012). La calidad del agua se biomonitoriza a través de los estudios de bioconcentración o bioacumulación de contaminantes en organismos de ambientes marinos o de agua dulce (Debén et al. 2015; García-Seoane et al. 2018). Estos estudios se realizan incluso a nivel de comunidad (Pandey et al. 2003). Se evalúa el uso de biomarcadores de exposición, efecto o susceptibilidad genética en especies centinela o en incluso comunidades, los conocidos como biomarcadores de campo.

En todos los medios podemos encontrar especies susceptibles de ser utilizadas en estos análisis. Numerosos autores han elaborado una lista con las características que se consideran importantes para que una especie sea apropiada y que se detallan a continuación (Rand and Petrocelli 1985; NCR 1991; White 2004; Berhet 2013):

- Ser sedentarias en la zona de estudio.
- Deben ser de fácil recolección, captura e identificación durante todo el año.
- Deben pertenecer a una población con un tamaño suficientemente grande para que su recolección tenga un impacto insignificante.
- Deben tener un amplio y conocido rango de distribución.
- Deben ser especies longevas y con cierta resistencia a los contaminantes.
- Deben permitir establecer relaciones dosis-efecto y causa-efecto.
- La biología de las especies debe ser suficientemente conocida.

Utilizar biomarcadores en estas especies permite comprobar el grado de exposición de estos organismos a los contaminantes y permite relacionar la concentración química y efecto biológico con una zona o un uso del suelo determinados (Cajaraville et al. 2000; Holmqvist et al. 2007), permitiendo conocer el estado de la población (Van der Oost et al. 2003).

- Microbioensayos y las ventajas que aportan en la protección total del ecosistema

Los bioensayos permiten monitorizar la calidad ambiental. Un bioensayo es una técnica por la cual un organismo (por ejemplo, una planta o un animal), un sistema biológico (p.e. los tejidos) o un proceso biológico (p.e. la actividad enzimática) son utilizados para medir los efectos de una sustancia (EPA/600/8-87/044 August 1987). Los organismos son expuestos a determinados contaminantes puros o en mezclas o a muestras ambientales indeterminadas complejas (Tejeda-Vera et al. 2007). Los bioensayos permiten evaluar de una manera holística estas muestras puesto que también se analizan los efectos aditivos, antagonistas y sinérgicos de sus componentes (Wadhia and Thompson 2007).

En la selección de los taxones utilizados en los bioensayos no se siguen criterios ecológicos por lo que el número utilizado no es muy elevado, sobre todo en hábitats terrestres. Utilizar tan pocos taxones lleva a que los resultados sean poco relevantes y no extrapolables a otras especies similares (Chung et al. 2007; Catala et al. 2009). Se ha comprobado que una sustancia que no induce ningún efecto en una especie puede tener un efecto letal en otra (van der Grinten et al. 2010). Los taxones que se utilizan en estos

bioensayos se deben elegir no solo por ser apropiados para su uso en el laboratorio o en el campo sino por su relevancia ecológica (Traba et al. 2017).

Para que la protección del ecosistema fuese posible, en los ensayos de toxicidad se necesitarían muchos ejemplares. Para albergar un gran número de especímenes, se requiere de instalaciones adecuadas. Trabajar con grandes volúmenes de la matriz tratada, conlleva a trabajar con grandes volúmenes de muestra ambiental, por lo que el coste y la duración de estos estudios también aumenta (Peinado et al. 2002; Fraysse et al. 2006; Wadhia and Thompson 2007; van der Grinten et al. 2010).

En la evaluación y control de la calidad medioambiental se hace cada vez más patente la necesidad de desarrollar herramientas más sensibles, fiables y coste-eficientes, las cuales presenten una mayor relevancia biológica y ecológicas (Marugán et al. 2012) suponiendo un reto para cualquier profesional. Se necesitan procedimientos a microescala o procedimientos de miniaturización, los cuales son conocidos como microbioensayos. Se caracterizan por reducir los organismos usados, por lo que en comparación con los bioensayos rutinarios son menos costosos. Gracias al uso de los microbioensayos se produce un monitoreo eficiente y por tanto mejoran las estrategias del control de la contaminación (Wadhia and Thompson 2007). Aumenta el carácter predictivo puesto que se puede realizar una evaluación de varios niveles tróficos.

La mayor parte de microbioensayos han sido utilizados para analizar la toxicidad acuática (tabla 2). Se han estandarizado de manera nacional e internacional. Existen una serie de microbioensayos que presentan una serie de ventajas: Los realizados con bacterias no requieren de cultivos previos puesto que comercialmente están disponibles de forma liofilizada y precisan de cortos tiempos de exposición. Por otra parte, las microalgas utilizadas en los microbioensayos presentan un rápido crecimiento (Janssen et al. 2011).

Tabla 2: Algunos de los organismos más usados en los análisis de la toxicidad acuática (Adaptada de Janssen, 1998)

Organismo/ Bioensayo	Parámetro/ Medición	Tiempo	Referencia
Toxicidad acuática			
Bacterias			
<i>Vibrio fischeri</i> Microtox ^R Microtox ^R fase sólida	Actividad enzimática Bioluminiscencia	5-30 min	Bulich et al., 1981
<i>Escherichia coli</i> Toxi- chromotest TM Sediment chromotest TM	Actividad B- galactosidasa Colorimétrica	60 min	Reinhartz et al., 1987
<i>Escherichia coli</i> MetPAD TM MetPLATE TM	Actividad B- galactosidasa Colorimétrica	2 horas	Bitton et al., 1992; 1994
<i>Bacillus sp.</i> ECHA biomonitor	Actividad deshidrogenasa Colorimétrica	24 horas	Dutka & Gorrie et al., 1988
Microalgas			
<i>Selenastrum capricornutum</i> Algotoxkit TM	Inhibición del crecimiento Absorbancia	72 horas	Persoone et al., 1998
<i>Tetrahymena thermophila</i> Protoxkit TM	Inhibición del crecimiento	24 horas	Pauli and Berger, 2000

En los últimos años, en los microbioensayos ha aumentado el uso de organismos representativos de hábitats terrestres (tabla 3). Los microbioensayos realizados con esporas y gametofitos de helecho permiten reducir los costes respecto a otros microbioensayos, puesto que se utiliza una tecnología de alto rendimiento (Catalá et al., 2009). De la misma manera, el uso de ficobiontes de líquenes permite aumentar la eficiencia en la evaluación y control de la polución puesto que se puede trabajar con un alto número de ejemplares con un bajo coste (Wadhia and Thompson 2007).

Tabla 3: Organismos recientemente utilizados en los análisis de la toxicidad terrestre

Organismo	Medición	Tiempo	Referencia
Toxicidad terrestre			
<i>Dryopteris guanchica gibby & jermy</i> (gametangio y esporas de helecho)	Actividad mitocondrial	24 horas	Catalá et al., 2009; Rodríguez-Gil et al., 2010
<i>Polystichum setiferum</i> (esporas de helecho)	Actividad mitocondrial Autofluorescencia de la clorofila Cuantificación del ADN	24-48 horas 24 horas a 1 semana	Feito et al., 2012, 2013; Esteban et al., 2013
<i>Asterochloris erici</i> y <i>Trebouxia sp. TR9</i> (ficobiontes de líquenes)	Dispersión óptica Autofluorescencia de la clorofila	24-96 horas	Dominguez-Morueco et al., 2014

En resumen, los microbioensayos respecto a los bioensayos rutinarios tienen un bajo coste por análisis. Se puede trabajar con pequeños volúmenes de muestra y con varias muestras a la vez. En muchos casos, no es necesario realizar cultivos previos, los requerimientos de laboratorio no son muy complejos y se obtienen resultados en breves espacios de tiempo. Además muestran repetitividad y reproducibilidad (Blaise 1991; Wolska et al. 2007). Para un seguimiento de la contaminación ambiental, los microbioensayos son muy adecuados puesto que permiten realizar pruebas que incluyan varios niveles tróficos (Janssen 1998).

1.2.1. Estudio de las alteraciones metabólicas utilizando la técnica FT-NIRS como biomarcadores de estrés

En las evaluaciones del riesgo ambiental ha aumentado la utilización de la técnica de espectrometría de infrarrojo cercano (NIRS).

Los espectros obtenidos por medio de esta técnica proporcionan información de la situación metabólica de toda la célula, la cual está afectada por factores intrínsecos y extrínsecos. Además, uno de los puntos más fuertes del uso de esta técnica, es que se

pueden utilizar células enteras sin necesidad de purificar o extraer componentes del metaboloma (Corte et al. 2011). Esta técnica presenta una serie de ventajas. Utiliza métodos sencillos de preparación de muestras, es una técnica rápida y relativamente barata, que permite analizar varias muestras simultáneamente. También evita los problemas de eliminación de residuos orgánicos y no es peligrosa porque no utiliza reactivos corrosivos o tóxicos (Mark et al. 2002; Cen and He 2007; Roggo et al. 2007a; Ozaki et al. 2016). NIR combinada con tratamientos matemáticos es una técnica alternativa que puede reemplazar a los métodos convencionales, como son la espectrometría de masas, la espectroscopia de resonancia magnética o la cromatografía de gases.

Esta técnica se basa en las interacciones entre el haz de luz incidente y la superficie del material (Chang et al., 2001) de acuerdo con la ley de Lambert-Beer, que establece que la concentración de un determinado absorbente es proporcional a la absorbancia medida (Osborne et al., 1997). Emplea pulsos de energía de $2,65 \times 10^{-19}$ a $7,96 \times 10^{-20}$ J, los cuales corresponden a los rangos de longitudes de onda de 750 a 2.500 nm (13.300 a 4.000 cm^{-1}) (Figura 1) (Pasquini 2003).

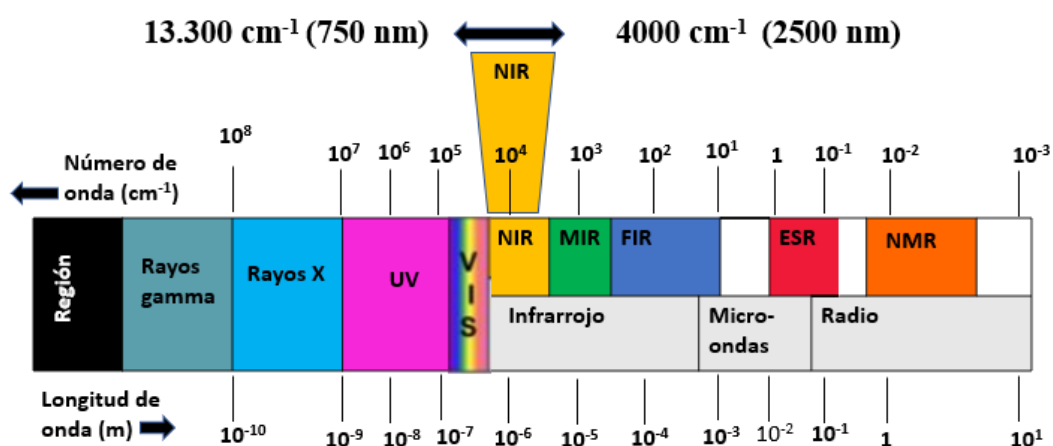


Figura 1: Diagrama que indica la distribución de la longitud de onda espectral.

El origen de las bandas de absorción del infrarrojo cercano es el mismo que en el infrarrojo medio. Una molécula absorberá la radiación NIR si la energía de radiación se corresponde a la diferencia energética entre 2 niveles vibracionales y se produce un cambio en el momento dipolar de la molécula. A diferencia del infrarrojo medio, no aparecen las bandas de las vibraciones fundamentales, sino que aparecen las absorciones debidas a los sobretonos (transiciones energéticas en las cuales la variación del número cuántico vibracional, n , es mayor de ± 1) y bandas de combinación de las vibraciones moleculares fundamentales (Figura 2). Las bandas de combinación son debidas a cambios simultáneos en la energía de dos o más modos de vibración y solo se produce en moléculas poliatómicas. Las bandas más frecuentes en NIR son debidas a enlaces que contienen átomos con importantes diferencias de peso molecular. Un ejemplo son C-H, N-H, O-H y S-H (Ciurczack 2008).

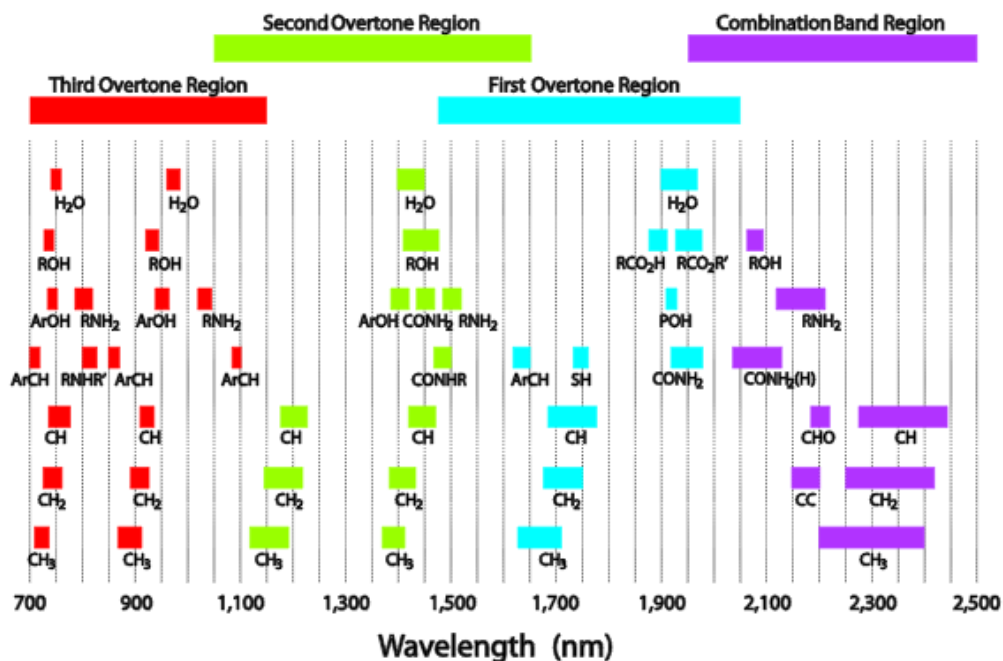


Figura 2: Principales bandas analíticas y posiciones relativas de los picos para absorciones prominentes en el infrarrojo cercano.

En el espectrómetro la fuente emisora emite una radiación infrarroja, la cual interactúa con la muestra (Figura 3). Para cada longitud de onda la radiación puede ser absorbida por uniones químicas específicas. Al mismo tiempo, energía con otra longitud de onda puede ser reflejada y/o transmitida por la muestra, siendo en este caso captada mediante un detector que mide reflectancia (sólidos y semisólidos), transmitancia (gases, líquidos, semilíquidos y ciertos sólidos) o transfectancia (líquidos y semilíquidos).

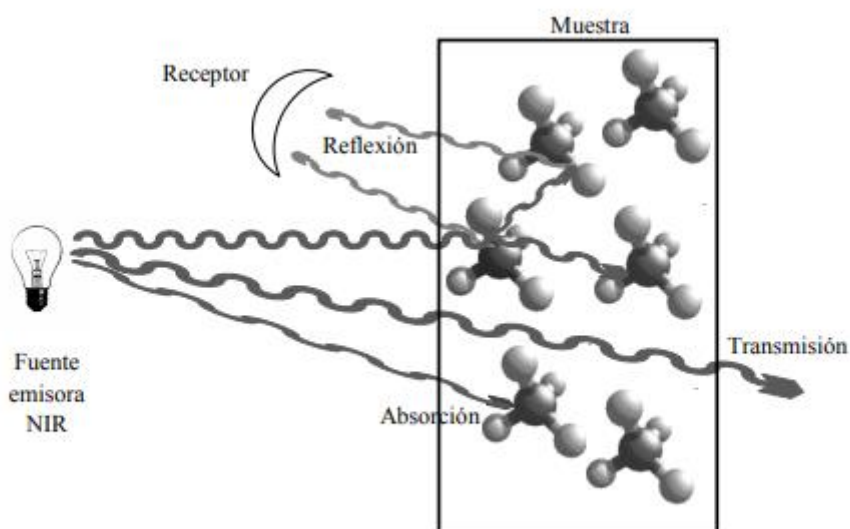


Figura 3: Dentro de la región NIRS, se muestra la interacción de la energía emitida a diferentes longitudes de onda con los diferentes enlaces moleculares de la muestra.

Esta información es procesada obteniendo un espectro que cubre el rango del infrarrojo cercano y está relacionado con las propiedades físicas, químicas y biológicas de la muestra. Este espectro único es como su huella dactilar (Pasquini, 2003, Osborne et al., 2003), el cual permite asociar cambios metabólicos con situaciones de estrés (Corte et al. 2010).

La interacción de las ondas electromagnéticas del infrarrojo cercano con los componentes de una muestra permite obtener información cualitativa y/o cuantitativa (Figura 4)(Pasquini 2003).

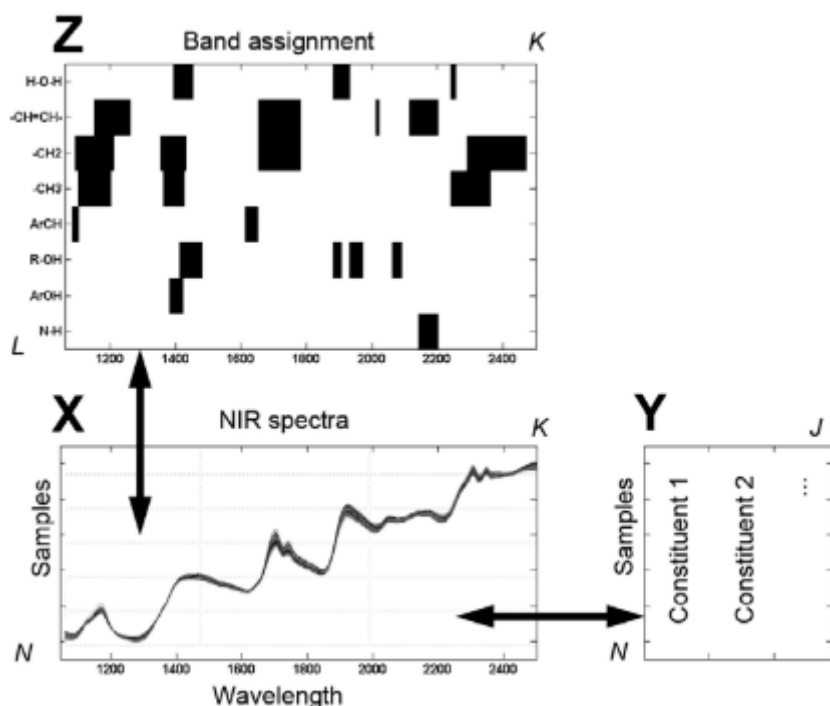


Figura 4: Diagrama en L. Los compuestos orgánicos (Y) se deducen a través de la relación establecida entre los picos del espectro(X) y las bandas de adsorción (enlaces moleculares) (Z). Imagen obtenida de Westad et al. (2008).

La alteración de la estructura y las propiedades de las biomoléculas celulares como los ácidos nucleicos, las proteínas, los carbohidratos y los lípidos se podría monitorizar gracias a la utilización de esta técnica que utiliza “huellas dactilares”(Takahashi et al. 1991; Gurbanov et al. 2018).

Cada biomolécula tiene un patrón de absorbancia del agua único(Tsenkova 2008a). El agua absorbe energía a lo largo de todo el espectro electromagnético, estando las bandas de agua ampliamente distribuidas en el rango NIR. La luz del infrarrojo cercano penetra profundamente en el agua, pero no se absorbe totalmente por lo que el espectro de luz que sale del agua puede volver a medirse. Este espectro contiene una gran información sobre los enlaces covalentes O-H y sobre los enlaces de hidrogeno relacionados con la estructura del agua y perturbados por el entorno y por el resto de las moléculas que existen en la solución(Tsenkova 2007). El cambio en la concentración de un analito concreto se refleja en los cambios de absorbancia de las bandas de agua. Esta característica permite construir un modelo de predicción, porque a nivel molecular la calidad del “espejo de

agua” permite medir pequeñas cantidades o alteraciones estructurales de las moléculas presentes en el sistema acuoso, tratando al mismo como un todo (Tsenkova 2007, 2008a, 2009a). Las bandas de absorbancia del agua en la aquafotómica se utilizan para la cuantificación indirecta, lo cual tiene una ventaja significativa puesto que el límite de detección del NIRS es la concentración de 5000 ppm (mgL^{-1}) o el 0,5% (p/v) y se basa en la utilización directa de las bandas de absorción de los respectivos analitos (Pasquini 2018). La aquafotómica presenta un nuevo enfoque para estudiar como un todo los sistemas biológicos y acuosos siendo complementaria al resto de disciplinas (genómicas, proteómica y metabolómica) (Tsenkova 2009b).

Objetivos

Las técnicas utilizadas para la evaluación de la contaminación ambiental tienen un carácter diagnóstico más que pronóstico, no contemplan los efectos sinérgicos de varios compuestos, ni tienen en cuenta la biodisponibilidad. Además, son estudios largos con altos costes que no utilizan especies con relevancia ecológica. Es por tanto necesario el desarrollo de herramientas de diagnóstico ambiental más sensibles, fiables, rápidas, de bajo coste y con carácter pronóstico, las cuales incluso serían muy útiles para detectar microcontaminantes.

Para conseguir desarrollar estas nuevas herramientas se persiguen los siguientes objetivos:

- a) La evaluación del uso de biomarcadores de campo para detectar contaminantes persistentes en sedimentos y bioacumulativos en la biota, lo cual permite gestionar de manera más eficiente la contaminación agrícola difusa. Para realizar esta comprobación, los biomarcadores de campo se analizarán en especies no objetivo, propias de un agroecosistema de regadío y se desarrollarán los siguientes objetivos específicos:
 1. Analizar el daño oxidativo en varios órganos del cangrejo rojo americano *Procambarus clarkii* tanto en poblaciones de referencia como en poblaciones expuestas a los contaminantes;
 2. Estudiar el daño oxidativo en dos árboles representativos del área de estudio; *Salix sp* como especie ribereña y *Quercus rotundifolia* como especie interior;
 3. Evaluar la capacidad del biomarcador estudiado para discriminar entre zonas de exposición en función de su nivel de carga agroquímica.

- b) Desarrollo de un microbioensayo coste-eficiente y rápido que sea capaz de detectar contaminantes en muestras ambientales. Para ello se utilizarán la autofluorescencia de la clorofila y los radicales libres intracelulares como biomarcadores en microalgas terrestres. Para lograr este propósito, se plantean los siguientes objetivos específicos:
 1. Diseñar un microbioensayo rentable y rápido para la detección de contaminantes basado en el ficobionte *Asterochloris erici*;
 2. Analizar cuál es el biomarcador rápido más apropiado para obtener resultados satisfactorios.

- c) Evaluación de la huella molecular por espectrometría de infrarrojo cercano para la detección de biomarcadores metabólicos de estrés ambiental. Para conseguir este fin se desarrollan los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar los cambios en la huella metabolómica de los diferentes estados del ciclo de desecación-rehidratación de la microalga líquénica *Asterchloris erici*
2. Analizar en profundidad la dinámica de las moléculas de agua mediante la acuafotónica y valorar su potencial en bioensayos de estrés ambiental.

CAPITULO 1

Analysis of lipid peroxidation in animal and plant tissues as field-based biomarker in Mediterranean irrigated agroecosystems (Extremadura, Spain)

Rosa De Las Heras, José Luis Rodríguez-Gil, Jon San Sebastian Sauto, Paz Sánchez Sánchez, and Myriam Catalá

JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH, PART B 2018, VOL. 0, NO. 0, 1–13

Keywords: Bioaccumulation; pesticides; sentinel species; *Procambarus clarkii*; *Salix* spp; *Quercus rotundifolia*; biomarkers.

Abstract

The development of field-based biomarkers can allow for a more reliable assessment of the exposure of organisms to pollutants. Different sampling sites, along two streams running through an irrigable agricultural area, were selected to evaluate the effect of agrochemical load on the measured endpoints. The levels of lipid peroxidation were evaluated in several organs of *Procambarus clarkii*. The same method was applied to leaves of two woody species. Determining levels of MDA (malonaldehyde) by thiobarbituric acid reactive substances assay allows measuring the levels of lipid peroxidation. Differences in lipid peroxidation levels were observed in *P. clarkii* individuals collected at different sites; however, the patterns varied depending on the organ (when accounting for variations due to sex). The use of a MDA-gills/MDA-hepatopancreas index allowed for discrimination between reference and polluted sites. Significant differences in oxidative damage between sites were found in the leaves of *Quercus rotundifolia* but not in *Salix sp.* The lipid peroxidation of crayfish organs and holm oak leaves as a suitable biomarker of environmental pollution deserves further investigation.

Introduction

West Mediterranean regions are susceptible to increasing problems caused by water scarcity during growing season. The rising demand for agricultural products and the quickly changing climatic conditions are resulting in an increase of irrigation-based agriculture (Poch-Massegú et al. 2014) in these areas, resulting in the application of irrigation methods to traditional rain-fed croplands as well as non-agricultural lands (Arroita et al. 2013). Current models of oceanic-atmospheric circulation (CGMs) predict a rise in temperature and a decrease on average precipitation in these Mediterranean regions, which will further decrease the availability of water (Candela et al. 2012). Plant protection products have been shown to reach water courses where they can cause effects in non-target organisms and the ecosystem. Most of these compounds belong to the group of persistent organic pollutants (POPs) that can pose a threat to the aquatic ecosystem and even human health. Apart from being highly toxic, they are resistant to degradation, are able to incorporate into the tissues of living beings, and can be transported through long distances. These pollutants exhibit low rates of metabolic degradation and can cause chronic damage to organisms exposed at low concentrations over long periods of time (Silva Barni et al. 2014). Therefore, it is necessary to assess their potential risks and their effect on water quality and associated ecosystems (Daam, M. A.; Van den Brink 2011).

Persistent organic pollutants partitioned into sediment, can accumulate in the tissues of aquatic organisms via the water column or direct interaction with the sediment (Tosti 2012b). Traditional chemical analysis of water samples could be complemented with monitoring of chemical concentrations, as well as the measurement of certain biomarkers, in local populations of sentinel organisms, since bioaccumulation of chemicals in biota may have adverse effects on ecosystems (Van der Oost et al. 2003). Organisms exposed to pollutants may suffer changes in their biochemical, molecular, cellular, or physiological levels. Biomarkers may connect the pollutants' concentration at target organs and their intrinsic toxicity with the bioavailability of compounds (Martín-Díaz et

al. 2004). These are useful tools for studying sub-lethal effects of pollutants on organisms and provide an early indication of possible adverse effects (Damásio et al. 2007). Biomarkers can show that the pollutants have entered the organisms; have been distributed through the tissues and have triggered a toxic effect on a critical target (Van der Oost et al. 2003). In recent years, biomarkers of exposure and effect have been evaluated in several sentinel species (Table 1). A useful biomarker should be, among other features, ecologically relevant, and represent a reliable link between an observable response and a biological effect (Lam 2009b). A number of highly-specific biomarkers can establish a cause and effect relationship between a particular pollutant and a biological response while other are less specific and contribute to the assessment of environmental exposure and possible effects. Both types of biomarkers can be very useful in monitoring programmes (Lam, P. K. S.; Wu 2003). Biotransformation of xenobiotics produces reactive oxygen species (ROS) which are buffered by defense systems. If this process is not held back, it can result in the inactivation of enzymes, lipid peroxidation, DNA damage and even cell death (Martín-Díaz et al. 2004), parameters that can be useful as biomarkers. ROS are formed and degraded in all aerobic organisms whose cells are constantly threatened by peroxidative damage (Vigo-Pelfrey 1990; Dix and Aikens 1993; Nordberg and Arnér 2001). Lipid peroxidation is one of the ROS targets more studied (Rikans and Hornbrook 1997) frequently assessed as malondialdehyde (MDA), a secondary product. The reflecting membrane dysfunction or degradation is the MDA (Thompson et al. 1988).

Sentinel species can serve as reliable targets for these studies, when properly selected, they are local to the habitat of study, serving as natural passive samplers. Localized exposure can allow monitoring agencies to link chemical concentrations and biological effect to a particular area or land-use (Cajaraville et al. 2000b; Holmqvist et al. 2007). The organism chosen as sentinel species should be naturally present in the environment, presenting low mobility, ecologically unthreatened and relevant in the studied ecosystem. Toxicity and accumulation of pollutants in crayfish has been frequently looked at (Schilderman et al. 1999; Holmqvist et al. 2007; Desouky et al. 2013; Al et al. 2014). *Procambarus clarkii* was introduced in Europe from the southern US and northern Mexico and quickly expanded through the south and east of Spain (Fernandes et al. 2002). *P. clarkii* is commonly considered as a good sentinel due to its wide distribution, its sedentary life, and its long life cycle (Schilderman et al. 1999; Sanchez Lopez, F J; Gil Garcia, M D; Martinez Vidal, Jose L; Aguilera, P A; Garrido Frenich 2003).

In an ecosystem, plant populations also have an enormous potential as sentinel species, because contaminants can be deposited on their leaves, especially sprayed pesticides, and absorbed by the roots, remaining on site (Winter and Streit 1992). The wood of their stem and the lipophilic cuticles of their leaves permit them to store trace elements from the environment. Willows (*Salix sp*) are commonly found stabilizing the banks in rivers and shores in wetlands showing extended and deep roots and high transpiration rate (Trapp et al. 2001). On the other hand, *Quercus rotundifolia* L. (holm oak) is an evergreen oak that forms mono-species woodlands in many Mediterranean areas. Its leaves are able to accumulate inorganic and organic pollutants all through the year, so this species is suitable for biomonitoring (Arena et al. 2013).

Table 1: Different biomarkers of exposure and effect in several sentinel species found in the literature

Kingdom	Taxon	Specific parameter	Biomarkers of exposure	of	Biomarkers of effect	Observations (organs analyzed)	Bibliographic references
Animals							
	Red swamp crayfish (<i>Procambarus clarkii</i>)	Cytochrome P450 monooxygenase system and acetylcholinesterase (AChE) activity	Cytochrome P450 monooxygenase system activity Acetylcholinesterase (AChE) activity			Hepatopancreas microsomes	(Porte and Escartín 1998)
	Polychaete worm (<i>Nereis diversicolor</i>) and clam (<i>Scrobicularia plana</i>)	The protein yield (PY), metallothionein (MT) levels, catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and the acetylcholinesterase (AChE) activities	Protein yield (PY) levels Metallothionein (MT) levels Catalase (CAT) activity Glutathione S-transferase (GST) activity Acetylcholinesterase (AChE) activity			Pooled digestive glands of several clams or various fragments of worm tissue	(Solé et al. 2009)

Kingdom	Taxon	Specific parameter	Biomarkers of exposure	Biomarkers of effect	Observations (organs analyzed)	Bibliographic references
	Native crayfish (<i>Austropotamobius pallipes</i>) and signal crayfish (<i>Pacifastacus leniusculus</i>)	Mean Epithelial Thickness (MET) Mean Diverticular Radius (MDR) Mean Luminal Radius (MLR) MED (MET/MDR ratio) MLE (MLR/MET ratio)	Metal concentration		Gills, digestive glands and abdominal muscle	(Anton et al. 2000)
	Carp (<i>Cyprinus carpio</i>) and red swamp crayfish (<i>Procambarus clarkii</i>)	Total cytochrome P450, NADPH-cytochrome (P450)c reductase, 7 ethoxy-resorufin O-deethylase (EROD), CYP3A, Glutathione S-transferases (GTS) and UDP-glucuronyl transferases (UDPGT)	Total cytochrome P450 components and activities NADPH-cytochrome (P450)c reductase activity 7 ethoxy-resorufin O-deethylase (EROD) activity		Fish liver and digestive gland crayfish	(Fernandes et al. 2002)

Kingdom	Taxon	Specific parameter	Biomarkers of exposure	Biomarkers of effect	Observations (organs analyzed)	Bibliographic references
			CYP3A immunodetection Glutathione S-transferases (GTS) activity UDP-glucuronyl transferases (UDPGT) activity			
	Rice field crab (<i>Esanthelphusa nani</i>)	Glutathione S-transferase (GST)	Glutathione S-transferase (GST) activity		Hepatopancreas	(Maneein et al. 2011)
	Fish(<i>Odontesthes bonariensis</i>)	Accumulation of organochlorine pesticides (OCPs), polychlorinated biphenyls (PCBs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and lipid peroxidation (LPO)	Organochlorine pesticides (OCPs) bioaccumulation Polychlorinated biphenyls (PCBs) bioaccumulation Polybrominated diphenyl ethers	Lipid peroxidation (LPO)	Gills, brain, muscle, liver and gonads	(Silva Barni et al. 2014)

Kingdom	Taxon	Specific parameter	Biomarkers of exposure	Biomarkers of effect	Observations (organs analyzed)	Bibliographic references
			(PBDEs) bioaccumulation			
	Clam (<i>Corbicula fluminea</i>)	CYP1A protein expression, changes in the activities of the antioxidant (AO) enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and the phase II biotransformation enzyme GST	CYP1A protein expression Superoxide dismutase (SOD) activity Catalase (CAT) activity Glutathione peroxidase (GPx) activity Glutathione reductase (GR) activity Phase II biotransformation enzyme GST activity		Visceral mass and foot	(Vranković and Slavić 2015)
	Mammals (<i>Neovison vison</i>)	Subcutaneous fat	Polychlorinated biphenyls (PCBs) bioaccumulation	Body condition (subcutaneous fat)		(Persson et al. 2013)

Kingdom	Taxon	Specific parameter	Biomarkers of exposure	Biomarkers of effect	Observations (organs analyzed)	Bibliographic references
			<p>Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) bioaccumulation</p> <p>Pesticides bioaccumulation</p>			
	Mussel (<i>Lasmigona costata</i>)	Metal levels, metallothionein concentrations, lipid peroxidation, antioxidant capacity against peroxy radicals and total protein and lipid concentration	<p>Metal levels</p> <p>Metallothionein concentrations</p> <p>Antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP)</p> <p>Protein and lipid levels</p>	Lipid peroxidation	Gills	(Gillis et al. 2014)
	Snapping turtle (<i>Chelydra serpentina</i>)	Biomarker DACT	<p>Atrazine bioaccumulation</p> <p>The atrazine metabolite diaminochlorotriazine</p>		Tail tissues (scales, muscle and blood) concentrations	(Douros et al. 2015)

Kingdom	Taxon	Specific parameter	Biomarkers of exposure	Biomarkers of effect	Observations (organs analyzed)	Bibliographic references
			(DACT) bioaccumulation Glyphosate burdens			
	<i>Fish (Capoeta umbla)</i>	Glutathione S-transferase (GST), cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) and acetylcholinesterase (AChE) activity	Glutathione S-transferase (GST) activity Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) activity Acetylcholinesterase (AChE) activity		Liver and gills	(Yildirim et al. 2014)
	<i>Fish (Astyanax aeneus)</i>	Hepatic glycogen levels and lipid peroxidation		Hepatic glycogen levels and lipid peroxidation	Liver, gills and muscle	(Trujillo-Jimenez, Patricia; Elias Sedeno-Diaz, Jacinto; Lopez-Lopez et al. 2001)

Kingdom	Taxon	Specific parameter	Biomarkers of exposure	Biomarkers of effect	Observations (organs analyzed)	Bibliographic references
	Clam (<i>Corbicula fluminea</i>)	Levels of Alkylphenols (APs) and bisphenol A (BPA) in water, sediments and biota	Bioaccumulation factor (BAF) Biota–sediment accumulation factor (BSAF or log BSAF)		Pools of soft tissue (removing the shell)	(Salgueiro-González et al. 2015)
	Grasshoppers (<i>Acrida chinensis</i>), locusts (<i>Oxya chinensis</i>), cabbage worms (<i>Pieris rapae</i> Linne), butterflies (<i>Eurema hecabe</i> Linnaeus), earthworms (<i>Eisenia foetida</i>), and Chinese toads (<i>Bufo gargarizans</i>)	Hexachlorobutadiene (HCBd) concentration and comparisons with organochlorine pesticides (OCPs)	Hexachlorobutadiene (HCBd) accumulation		All aboveground parts for rice Stems and leaves in other plants Complete small animals without viscera Muscle tissues for Chinese toads	(Tang et al. 2014)

Kingdom	Taxon	Specific parameter	Biomarkers of exposure	of	Biomarkers of effect	Observations (organs analyzed)	Bibliographic references
	Fish (<i>Carassius auratus</i> , <i>Cyprinus caspio</i> , and <i>Channa argus</i>), and shrimp (<i>Macrobrachium nipponense</i>)	The concentration of 12 organochlorine pesticides (OCPs)	OCPs bioaccumulation			Fish muscle Shrimp mussel	(Zhang et al. 2014)
Lichens							
	Lichen (<i>Usnea barbata</i>)	Concentrations of 26 elements	Trace metal accumulation			Digested lichens	(Conti et al. 2009)
	Lichen (<i>Rinodina sophodes</i>)	Estimation of PAHs contents	Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) accumulation			Air-dried lichen	(Satya et al. 2012)
	Lichen (<i>Pyxine cocoes</i>)	Metal analysis, the chlorophyll stability index, chlorophyll degradation and carotenoid contents	Toxic elements (Al, As, Pb) and heavy metals (Cd, Cr, Cu, Fe, Zn) accumulation			Lichen thallus	(Bajpai and Upreti 2012)

Kingdom	Taxon	Specific parameter	Biomarkers of exposure	Biomarkers of effect	Observations (organs analyzed)	Bibliographic references
	Lichen (<i>Ramalina celastri</i>)	Physiological determinations (chlorophyll a (Chl-a), chlorophyll b (Chl-b), phaeophytin a (Phaeoph-a), malondialdehyde (MDA), hydroperoxy conjugated dienes (HPCD), sulphur content (S), dry weight/fresh weight ratio (DW/FW) Determination of heavy metal concentration	Heavy metal accumulation	Foliar damage index (FDI) for <i>Tillandsia</i> A pollution index (PI) for <i>R. celastri</i>	<i>Tillandsia</i> leaves <i>R. celastri</i> thallus	(Bermudez et al. 2009)
Others	Epiphytes (<i>Tillandsia capillaris</i> Ruiz and Pav. f. <i>capillaris</i> , <i>T. recurvata</i> L., <i>T. tricholepis</i> Baker)	Physiological determinations (chlorophyll a (Chl-a), chlorophyll b (Chl-b), phaeophytin a (Phaeoph-a), malondialdehyde	Heavy metal accumulation	Foliar damage index (FDI) for <i>Tillandsia</i> A pollution index (PI) for <i>R. celastri</i>	<i>Tillandsia</i> leaves <i>R. celastri</i> thallus	(Bermudez et al. 2009)

Kingdom	Taxon	Specific parameter	Biomarkers of exposure	Biomarkers of effect	Observations (organs analyzed)	Bibliographic references
		(MDA), hydroperoxy conjugated dienes (HPCD), sulphur content (S), dry weight/fresh weight ratio (DW/FW) Determination of heavy metal concentration				
Plants						
	Rice (<i>Oryza sativa</i>), Brinjal (<i>Solanum melongena</i> , spinach (<i>Spinacea oleracea</i>) and radish (<i>Raphanus sativus</i>)	Soil contamination and bioaccumulation of six heavy metals and two pesticides	Six heavy metals cadmium (Cd), chromium (Cr), iron (Fe), copper (Cu), nickel (Ni), and zinc (Zn) Two pesticides [1,1-bis(p-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane; DDT] and benzene		Whole plants	(Mishra et al. 2009)

Kingdom	Taxon	Specific parameter	Biomarkers of exposure	Biomarkers of effect	Observations (organs analyzed)	Bibliographic references
			hexa chloride (BHC) accumulation			
	<i>N. laevis</i> , <i>C. colocynthis</i> , <i>N. bisserata</i> , <i>M. esculenta</i> , <i>P. purpureum</i> , <i>Z. mays</i> , <i>M. indica</i> , <i>M. pudica</i> , <i>E. guineensis</i> , <i>C. papaya</i> , <i>T. cacao</i> , <i>M. sapientum</i> , <i>C. odorata</i> , <i>P. purpureum</i> , <i>T. scleroxylon</i> , <i>C. arabica</i> , <i>P. guajava</i> , <i>M. sloanei</i> , <i>T. diversifolia</i> , <i>R. racemosa</i> , <i>N. frutican</i> , and <i>A. africana</i>	The concentrations of organochlorine pesticides (OCPs)	Organochlorine pesticides (OCPs) bioaccumulation		Leaves and whole plants	(Sojinu et al. 2012)
	<i>Pinus pinaster Ait.</i>	Presence of heavy metals and the levels of markers of oxidative stress (lipid hydroperoxide levels, thiol groups,	Heat shock protein 70 expression Heme oxygenase expression	Lipid hydroperoxide levels	Needles	(Acquaviva et al. 2012)

Kingdom	Taxon	Specific parameter	Biomarkers of exposure	Biomarkers of effect	Observations (organs analyzed)	Bibliographic references
		superoxide dismutase activity and expression of heat shock protein 70, heme oxygenase and superoxide dismutase)	Superoxide dismutase Activity Heavy metal accumulation			
	<i>Quercus rotundifolia</i>	Metal and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) content Analysis morphological (functional traits), biochemical (pigment content, antioxidant capacity, and Poly(ADP-Ribose) Polymerase Activity), and physiological (partitioning of absorbed light in the photosynthetic process)	High metal accumulation PAH accumulation		Leaves	(Arena et al. 2013)

Kingdom	Taxon	Specific parameter	Biomarkers of exposure	Biomarkers of effect	Observations (organs analyzed)	Bibliographic references
	Perennial grass (<i>Glyceria maxima</i>)	The content of nutrients and trace metals	Trace metals and macroelements accumulation		Leaves, stems, rhizomes and roots	(Klink et al. 2014)
	Rice (<i>Oryza sativa</i>), cabbage (<i>Brassica chinensis</i>), cowpea (<i>Vigna unguiculata</i>), pumpkin (<i>Cucurbita moschata</i>), mustard (<i>Brassica juncea</i>), cauliflower (<i>Brassica oleracea</i>)	Hexachlorobutadiene (HCBd) concentration and comparisons with organochlorine pesticides (OCPs)	Hexachlorobutadiene (HCBd) accumulation		All aboveground parts for rice Stems and leaves in other plants Complete small animals without viscera Muscle tissues for Chinese toads	(Tang et al. 2014)
	Aquatic plant (<i>Potamogeton crispus</i> Linn, <i>Potamogeton lucens</i> Linn, and	The concentration of 12 organochlorine pesticides (OCPs)	OCPs bioaccumulation		Fish muscle Shrimp mussel	(Zhang et al. 2014)

Kingdom	Taxon	Specific parameter	Biomarkers exposure of	Biomarkers of effect	Observations (organs analyzed)	Bibliographic references
	<i>Potamogeton pectinatus</i> Linn)					

In summary, diffuse agricultural pollution can affect non-target animal and plant species, but its detection and management can be complex and costly. In this context, the development of field-based biomarkers could allow for a more direct assessment of the exposure of organisms to pollutants. These biomarkers, based on adequate sentinel species, could be used as an efficient complementary tool in the evaluation of environmental pollution. To achieve this goal, the specific objectives of this study are: (1) to analyze the oxidative damage in a number of organs of *P. clarkii* from reference and exposed populations; (2) to study the oxidative damage in two representative plants local to the study area; *Salix sp* as riparian species and *Quercus rotundifolia* as inland species; and (3) to assess the ability of the studied biomarker to discriminate between sites based on their level of agrochemical load.

Material and methods

Study area and sampling sites

The Centro de Extremadura irrigable area is located in the provinces of Cáceres and Badajoz (Western Spain). The Centro de Extremadura Irrigation Zone gets its water resources from Guadiana River. The original landscape formed by rain-fed agriculture and oak wood pasture together with seasonal wetlands(Barbero 2005). The main crops in the area are rice (50%), olive groves (10%), maize (25%) and tomato (10%)(MAGRAMA 2010) which are irrigated by a network of channels flowing from Cíjara (1,505 hm³) and García de Sola (554 hm³) reservoirs. Rice is primarily grown on poorly drained soils with claypans and impervious hardpans that are not appropriate to other crops(Global Rice Science Partnership (GRiSP) 2013). Despite these increasing intensive uses, the zone is also able to shelter a massive colony of cranes(Avilés et al. 2006) as much as many other interesting wild species associated to the dehesa agroecosystem typical of southern and western Iberian Peninsula(Moreno et al. 2016). The Cubilar and Gargaligas Rivers which are both tributaries of the Guadiana River, flow through the study area. The sampling points selected are represented in the Figure 1. Points D5 and D9 were located at different irrigation channels. D1 and D2 were positioned at the entrance of Cubilar and Gargaligas Rivers respectively to the monitored irrigation area. A5 was located at the exit of Cubilar River and A9 was located at the exit of Gargaligas River. C3 was located in the Gargaligas River after receiving the waters of the Cubilar and downstream of the irrigated area in exploitation. Point DR was positioned in the drainage of a rice field into the Cubilar River(Rodríguez-Gil et al. 2013). Sampling points D1 and D2 were considered as control points. However, the sampling points A9, A5, DR and C3 were considered impact points. Alphanumerical codification for samples came from a previous water quality monitoring plan for the irrigated area where A was for rivers and streams crossing the area, B for wells and reservoirs (not applicable here) and C for rivers where outflow was spilled. Additionally, D points completed the defective in-out pattern. Nomenclature was preserved for possible data comparison with former analysis and reports. Traditional water quality characterization was carried out in these sites including measurements of a number of plant protection products commonly used in the area. Additionally a number of pharmaceutical active ingredients were quantified in sampling site C3 (Table 2)(Rodríguez-Gil et al. 2013).

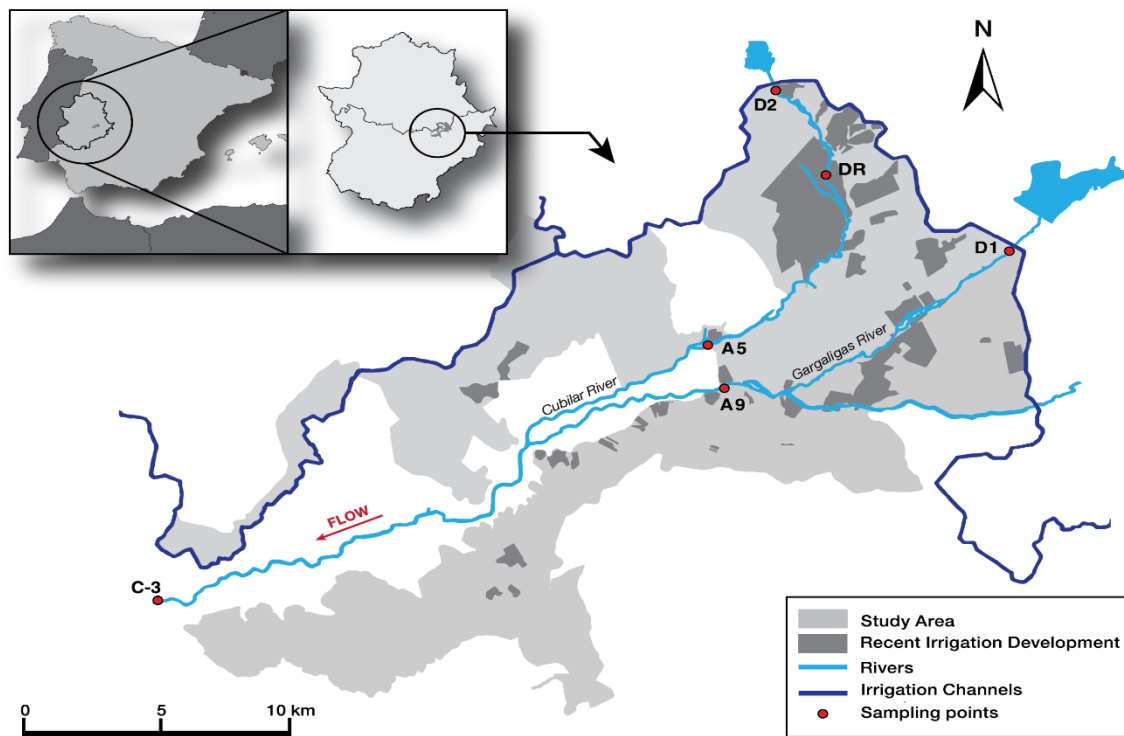


Figure 1. Map of the area of study (Spain)

Table 2: The values for pH, conductivity and Toxic Units for the different sampling sites (from Rodríguez-Gil et al., 2013)

Sampling point	Water analysis				Toxic Units	Biota analysis		
	pH	(μ S/cm)	Microcontamination (μ g/l) Pesticides/Pharmaceuticals		TU	<i>Salix sp.</i>	<i>Q.rotundifolia</i>	<i>P.clarkii</i>
D2	7.07	210	<q.l.	n.e.	n.e.	<q.l.	<q.l.	<q.l.
DR	6.90	457	Atrazine (0.99) Oxadiazon (0.80)	n.e.	14.5	<q.l.	Oxadiazon (0.024) Terbutylazine (0.012)	<q.l.
A5	7.30	415	Molinate (2.39) Oxadiazon (0.15)	n.e.	8.11	<q.l.	n.e.	<q.l.
D1	7.42	221	<q.l.	n.e.	n.e.	<q.l.	n.e.	<q.l.
A9	7.43	358	Diuron (0.13)	n.e.	65	<q.l.	n.e.	<q.l.g
C3	7.41	373	Molinate (1.92)	Cafeine (0.226)	6.51	<q.l.	<q.l.	Oxadiazon (0.01)

Sampling point	Water analysis			Toxic Units	Biota analysis		
	pH	(μ S/cm)	Microcontamination (μ g/l) Pesticides/Pharmaceuticals	TU	<i>Salix sp.</i>	<i>Q.rotundifolia</i>	<i>P.clarkii</i>
			Oxadiazon (0.12) Cotinine (0.042) Ivermectine (0.093) Nicotine (0.327) Paraxanthine (0.086)				

<q.l., below quantification limit: n.e, not evaluated.

Sampling of the biological material

Red swamp crayfish

In the Cubilar basin (D2, A5 and DR) and in the downstream site (C3), a minimum of eight individuals of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard, 1852) were trap-sampled out of each sampling site (Rodríguez-Gil et al. 2013). All individuals were anesthetized on ice. They were then stored in 80% ethanol supplemented with 2% BHT antioxidant (BHT ethanol) (Catala et al. 2013). At the end of the sampling day, the crustaceans were dissected according to the method of Ocete et al (1984) (Ocete, M.E.; Hermosin, M & López 1984). The hepatopancreas, gills and abdominal muscle of each individual were extracted and preserved in cold ethanol-BHT on ice until arrival to the laboratory where they were stored at -20 °C. All sampled individuals were sexed. Morphological differentiation of the first and second pairs of abdominal appendages (i.e., the copulatory appendages) of male crayfish is a good external clue to separate samples by sex in field work. Males have a copulatory organ formed by a modification of the first and second pair of pleopods whereas in females the first pair of abdominal appendages is vestigial and the second has no modification (Loureiro et al. 2015). Whenever sexing was doubtful, sample was discarded. Later sexing was checked during dissection. The crayfish length was also recorded.

Samples of local plant populations

From the 7th to the 11th of July in 2008, in the margins of waterways, leaf samples of individuals of the genus *Salix* were taken, according to the availability of the species at each point. Sampling points were D2, DR, A5, D1, A9 and C3. Similarly, leaf samples of *Quercus rotundifolia* individuals from surrounding areas were taken. In this case, sampling points were D2 and DR. The analysis was performed from pools of leaves of different individuals of each point.

Collected samples were stored in 80% ethanol supplemented with 2% BHT antioxidant (BHT ethanol) on ice until the arrival to the laboratory where they were stored at -20 °C.

Analysis of lipid peroxidation in environmental samples

The method described by Reilly & Aust (2001) (Reilly and Aust 2001) and afterwards modified (Feito et al. 2012a) was used to evaluate the level of lipid peroxidation in the collected plant and animal tissue. Hepatopancreas, gills and abdominal muscle of *Procambarus clarkii* samples (preserved in ethanol-BHT) and blades of *Salix spp* and *Quercus rotundifolia* were analyzed. Hepatopancreas, gill and abdominal muscle samples were homogenized in BHT-ethanol at a concentration of 50 and 100 mg tissue / ml respectively in a volume of 800–1000 mL with a SilentCrusher 3F blade micro-homogenizer. Plant samples were homogenized in ethanol-BHT at a concentration of 50 mg/ml in a volume of 8–10 ml using SilentCrusher 7F blade homogenizer. At each sampling site, a total of 3 “pools” generated by randomly collecting individual leaves were analyzed. The homogenates were incubated with a trichloroacetic acid–thiobarbituric acid–hydrogen chloride acid (0.92 M of TCA, 0.026 M of TBA and 3.20 M of HCl) solution at 70°C for an hour in a 500:900 sample:acid (v:v) ratio. During incubation the TBA reacts with malondialdehyde, secondary product of lipid peroxidation, to form a TBA–MDA–TBA complex. Absorbance of the TBA–MDA–

TBA complex was measured at 532 nm (Rodríguez-Gil et al. 2013). A standard curve was prepared with 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TEP), which can generate the TBA–MDA–TBA complex when acid-exposed to TBA. The level of lipid peroxidation is, thus, presented as TEP equivalents (Barylá et al. 2000; Wang and Jiang 2007).

Statistical analysis

Preliminary data exploration was performed following the recommendations of Zuur et al. (2010) (Zuur et al. 2010). Boxplot showing the median and the spread of the data is displayed, as well as the minimum and maximum values, quartiles Q1, Q2 or median and Q3, and the existence of outliers and symmetry of the distribution. Cleveland dotplot in which the row number of an observation is plotted vs. the observation value is also presented. Points that stick out on the right-hand side or left-hand side are observed values that are significantly longer or smaller than the majority of the observations. Two data points were considered as outliers based on these analyses. Their status as outliers was supported from laboratory observations of excessive crystal formation during MDA quantification. These two data points were excluded from the final data set. Data was analyzed using linear regression methodologies in R (R Development Core Team 2008). Preliminary data analysis (Figs. 2 and 3) showed a high level of correlation between sex and length in the *P. clarkii* data, advising against the inclusion of both variables together in any subsequent models. Given the suspected physiological relevance of the parameter, the effect of Sex was considered in the following analyses. For each of the evaluated *P. clarkii* endpoints (lipid peroxidation in hepatopancreas, gills as well as the hepatopancreas: gill ratio) linear regression was performed evaluating the effect of sampling site and sex as well as the interactive effect of site and sex. If the interaction term was considered to be non-significantly different from 0 (a $D > 0.05$) on a first analysis, then a second model with just site and sex was generated. Because of the sampling restrictions of the study, the final data set had an unbalanced structure (unequal number of samples in the different groups), requiring the use of Type III sum of squares when considering interactions between variables. In order to account for this, the function “Anova” in the R package “car” (Fox and Weisberg 2011) was used to generate the variance tables.

Additionally, the function “HSD.test” from the R package “agricolae” (de Mendiburu 2015) was used to generate a Tukey HSD test. In the cases where the interaction term was not considered in the model, Type II sum of squares was used instead. Only the effect of sampling site was evaluated for the plant tissue samples. Traditional ANOVA was applied to the *Salix* sp. data via the “aov” and “TukeyHSD” functions, as well as to the different *P. clarkii* measures when analyzed for males and females independently. A t-test was used to assess the site differences on the *Q. rotundifolia* data. The assumptions of the linear regression models were evaluated visually via residual and Q-Q plots. Whenever the raw data did not meet the assumptions, several transformations were tested. Squared root transformation was required to meet the assumptions of the final models for gill and MDA-hepatopancreas/MDA-gills index data.

Results

Morphometric studies of samples of Procambarus clarkii

Clear sexual dimorphism was observed in the captured individuals of *P. clarkii*, with males showing larger average length (13.3 cm) than females (11.1) (Fig. 2). Additionally, the average length of the captured individuals varied among sampling sites (Fig. 3), with significantly longer individuals (both males and females) in the downstream site (C3).

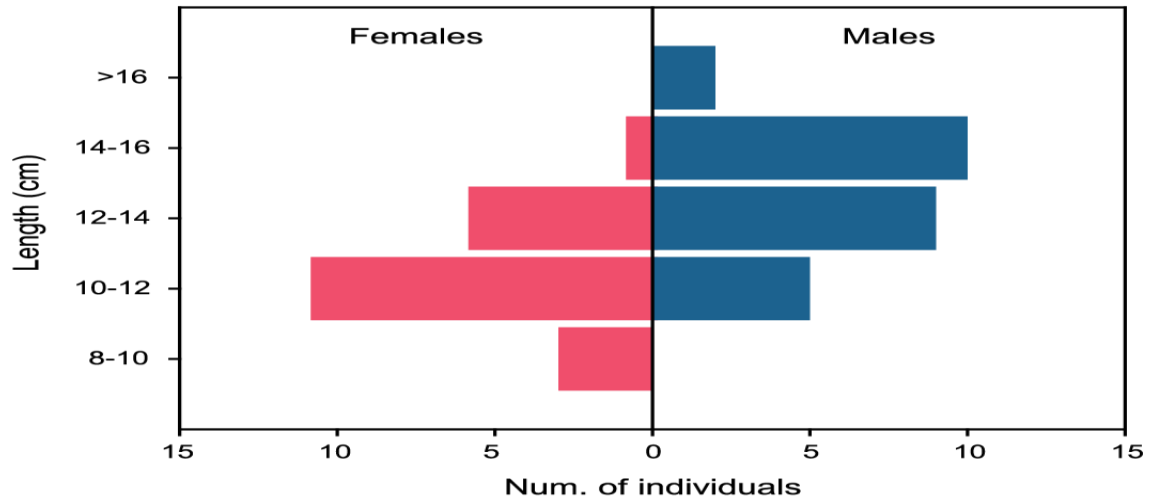


Figure 2. Length and sex distribution of the sampled *P. clarkii* individuals (all sites) showing clear sexual dimorphism with larger males.

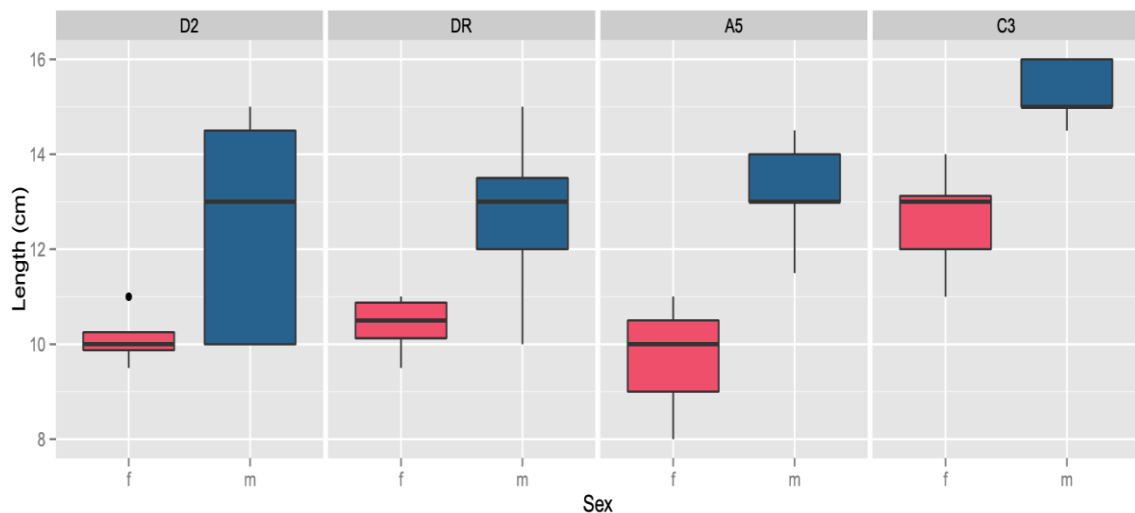


Figure 3. Boxplot of the length of the sampled *P. clarkii* individuals by site and sex. The middle line of each box represents the median length for each site/sex group with the box expanding between the 25th and 75th centile of the distribution. Whiskers represent maximum and minimum lengths not flagged as outliers. Individual points lay above or below 1.5 the limit of the box.

Lipid peroxidation in Procambarus clarkii

The level of oxidative damage was analyzed in hepatopancreas, gill tissue and abdominal muscle of *P. clarkii* and compared among the different sampling sites (D2, DR, A5 and

C3). Figure 4, shows the measured TEP equivalents in hepatopancreas (upper panel) and gill (lower panel) for each sampled *P. clarkii* individual for each sampling site. Abdominal muscle lipid peroxidation was always under the detection limit of the method (data not shown). Lipid peroxidation levels in hepatopancreas tissue tends to decrease with size/sex (both variables were strongly co-related) on all sampling sites with the exception of DR (rice paddy drainage), where this trend is less apparent (Fig. 4 upper panel). When considering all sampled individuals (males and females) linear regression indicates a non-significant interaction between sex and sampling site. Post-hoc tests (Fig. 5, panel A) show a significant difference in TEP equivalents between the reference site (D2) and A5, with A5 levels being lower. When evaluated for males and females separately (Fig. 5, panel D), no significant effect of sampling site is observed for the female individuals, however the same difference between the reference site (D2) and A5 remains significant. Lipid peroxidation levels in gill tissue do not seem to vary with length/sex as markedly as they do for hepatopancreas (Fig. 4 lower panel). When evaluating all individuals together (males and females), linear regression shows the effects of sampling site, sex, and the interaction between sampling site and sex to be significant. Post-hoc tests (Fig. 5, panel B) further indicates the mean TEP equivalents measured in the gill tissues of individuals captured in the downstream site (C3) to be significantly higher than the average values measured in individuals captured in the reference site (D2) as well as A5. When evaluated for males and females separately (Fig. 5, panel E), female *P. clarkii* individuals show no difference in measured TEP equivalents among sites while males sampled in the downstream site (C3) present significantly higher levels than those in all other sampled sites. The ratio between the measured TEP equivalents in hepatopancreas and gill (MDA-hepatopancreas/MDA-gills index) was considered as a potential measure of overall oxidative stress. When evaluated for all sampled individuals (Fig. 5, panel C) linear regression shows the effects of sampling site, sex, and the interaction between sampling site and sex to be significant. Post-hoc tests further indicate the mean MDA-hepatopancreas/MDA-gills index of the individuals captured in the rice paddy drainage (site DR) is significantly lower than that of the individuals in the reference site (D2). When evaluated for males and females separately (Fig. 5, panel F), female *P. clarkii* individuals show no difference in MDA-hepatopancreas/MDA-gills index. Males sampled on the downstream site (C3), however, present significantly lower values than those from the reference site (D2).

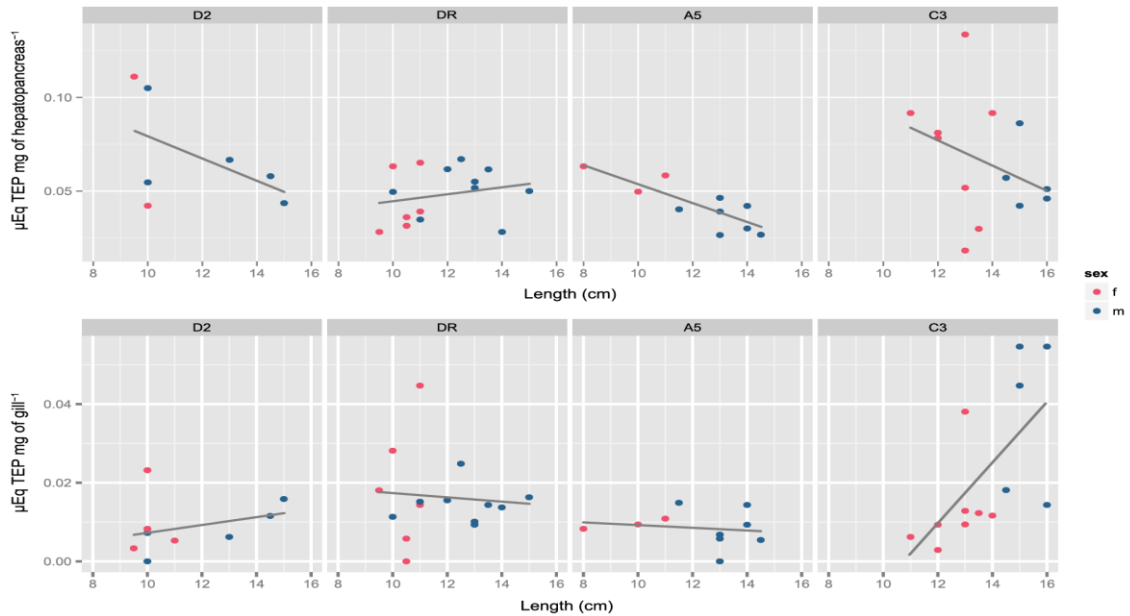


Figure 4. Measured TEP equivalents in hepatopancreas (upper panel) and gill (lower panel) for each sampled *P. clarkii* individual. Data is presented segregated by sampling site and across the measured length of the sampled individual, with colours representing individual sex. For reference, a simple linear regression was fit to each group of data points to visualize the relationship between size/sex and lipid peroxidation.

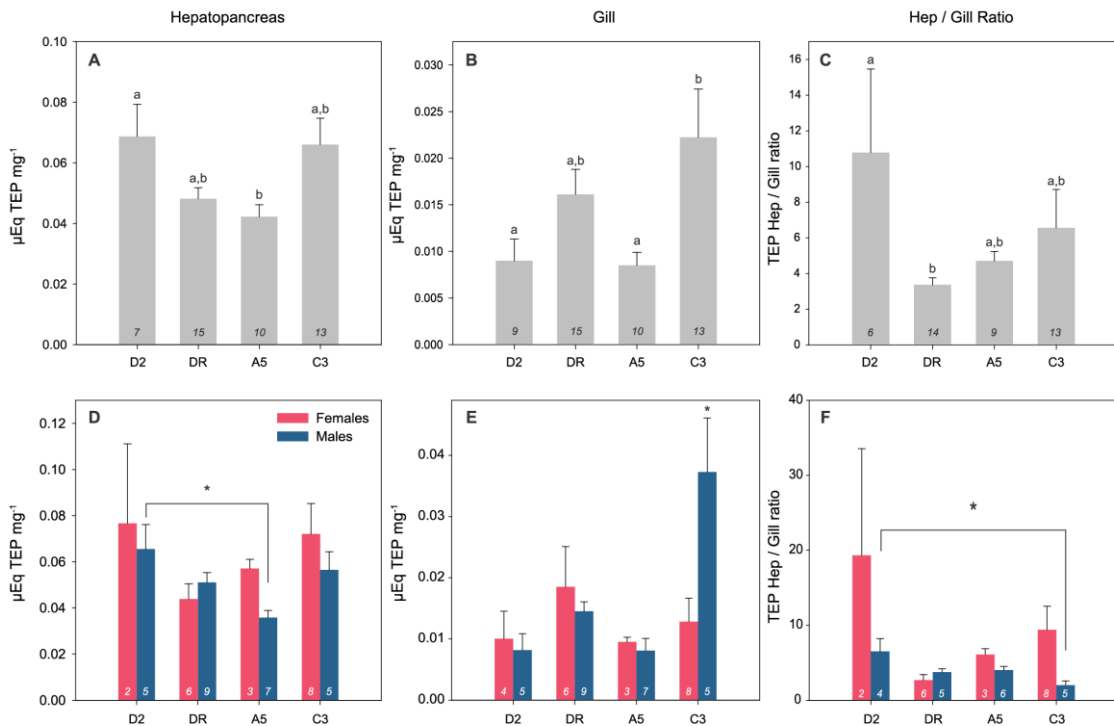


Figure 5. Measured TEP equivalents (levels of lipid peroxidation) in hepatopancreas (panels A and D) and gills (panels B and E) as well as the ratio of TEP equivalents between hepatopancreas and gills (Hep/Gill ratio, panels C and F). The sampling site were D2 (in the entrance of Cubilar), DR (in the drainage of a rice field), A5 (in the exit of Cubilar River) and C3 (in the confluence of both Rivers downstream of the study area).

Upper panels represent mean values for all individuals sampled in each sampling site. Lower panels have been segregated by sex. Error bars represent the standard error of the mean. The number of individuals per group (n) appears at the base of each column. Different letters (per panel) indicate significantly different means (a D 0.05). Asterisks in the lower panels represent statistically different means (a D 0.05). In this case, when no specific comparison is indicated, the marked group is statistically different from all other sampling points in the same sex.

Lipid peroxidation in plants

Oxidative damage was studied in *Salix spp.* as riparian species and in *Quercus rotundifolia* as a representative of the vegetation in the surrounding areas. Leaves of individuals of willow (*Salix fragilis* and/or *Salix purpurea lambertiana* subspecies) were collected in the sampling points of the basins of the Culbilar and Gargaligas Rivers within the study area. In Figure 6A, the levels of lipid peroxidation found in the different pools of leaves taken at the sampling sites are presented. The differences between peroxidation damage in the genus *Salix* leaves collected at different sampling sites are not significant ($p > 0.05$). Leaves of individuals of *Quercus rotundifolia* at places close to the sampling sites of the basins were collected. Figure 6B illustrates the level of lipid peroxidation measured in the collected leaves. Plant tissues of the holm oaks located near the drainage of a rice field (DR) show significantly higher mean levels of TEP equivalents than those from leaves collected from trees at the point of entry of Cubilar River in the study area (D2).

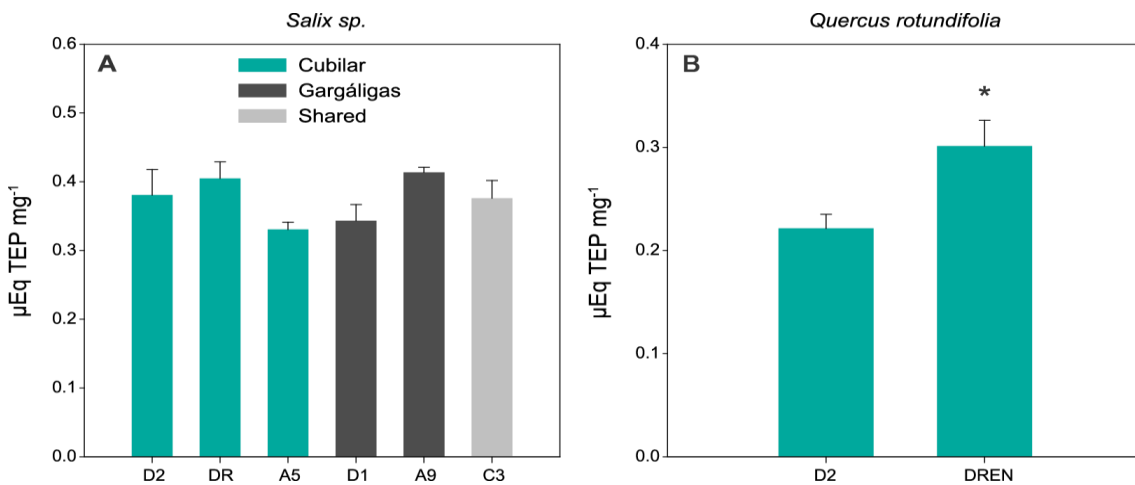


Figure 6. TEP equivalents (lipid peroxidation) measured in the leaves of *Salix spp* (A) and *Quercus rotundifolia*(B). The colours on panel A, indicate whether the sampling points belong to the Cubilar and Gargaligas basins (C3 is shared) rivers of the area of study “Centro de Extremadura”. Error bars represent the standard error of the mean. Asteriks (*) indicates significantly different mean TEP values ($p < 0.05$).

Discussion

In our study, we measured the levels of lipid peroxidation in gills and hepatopancreas of individuals of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) collected on sampling sites along the Cubilar River. The sex and the size of each red swamp crayfish influenced the different levels of peroxidation of gills and hepatopancreas. The index MDA-hepatopancreas/MDA-gills allowed for the best differentiation between reference and contaminated sites. We did not find significant differences in the levels of lipid peroxidation in the leaves of willow (*Salix spp.*); however, the levels of lipid peroxidation of the leaves of holm oak (*Quercus rotundifolia*) were higher in contaminated vs. reference sites. A review of the literature shows that studies assessing organism exposure to pollutants is larger than those assessing the real deleterious effects that these xenobiotic agents may produce when the natural defence mechanisms are overwhelmed (i.e. detoxification metabolism) (Table 1). Nonetheless, establishing a link between a biomarker of damage and the biological effect on the organism, population or ecosystem is still difficult (Lam, P. K. S.; Wu 2003).

Red swamp crayfish was chosen as sentinel species because this invasive invertebrate species is widespread in freshwaters of the Iberian Peninsula (Porte and Escartín 1998; Fernandes et al. 2002; Vioque-Fernández et al. 2009) and its capture does not present ethical or conservation issues regarding systematic biomonitoring. Its activity causes damage to irrigation canals and rice crops (Cano and Jiménez 2003). Red swamp crayfish is readily exposed to pesticides by ingesting contaminated sediments, debris, plants and invertebrates. Crayfish is often a keystone predator and transfer material and energy between multiple trophic levels (Momot 1995; Fornstrom et al. 1997). The hepatopancreas is the main organ responsible for the biotransformation of xenobiotics (Porte and Escartín 1998) and is an indicator of metabolism, ecdysis phase, nutritional status and health in crustaceans (Xiao et al. 2014). Besides, this organ has been reported to inform about water pollution (Borković et al. 2008). There are significant differences between the levels of lipid peroxidation of males collected in the reference site (D2) and the levels of males collected in the exit of Cubilar River site (A5). Although, the sampling site A5 was considered as point of impact, the levels of lipid peroxidation are lower in respect to the levels of individuals collected in the reference site.

The gills are in intimate contact with water and they are the first target for waterborne pollution (Borković et al. 2008; Wei and Yang 2015). The levels of lipid peroxidation in gills increased in the most contaminated sites. In the downstream site C3, the males collected presented significantly higher levels of lipid peroxidation than those collected in the reference site (D2) and in site A5. The chemical characterization of the area previously published (Rodríguez-Gil et al. 2013) detected pharmaceuticals and pesticide residues in this sampling site. In particular red swamp crayfish collected at C3 have oxadiazon residues, an herbicide associated with rice farming. Gillis et al. (2014) (Gillis et al. 2014) found evidence of oxidative stress in mussels captured river downstream and elevated levels of lipid peroxidation. We see that the levels of lipid peroxidation not only vary according to the degree of pollution of each sampling site, but also present different values depending on the organ where it is evaluated and according to the sex and/or size of the individual. The MDA-hepatopancreas/MDA-gills index was calculated to remove some of the uncertainty associated with this individual variability. We found that the

index showed the highest values on the individuals collected on the reference site at the entrance to the study area, while sites downstream presented the lowest levels in good correlation with low and high micropollutants presence respectively and with the results of microbioassays presented (Rodríguez-Gil et al. 2013).

Macrophytes play a functional and structural role in lentic and lotic ecosystems since pesticides may enter adjacent biotopes by spray drift (Belgers et al. 2007). Willows were chosen as potential sentinel species. These trees are linked to watercourses. Lack of differences among the different sampling sites make lipid peroxidation in willow leaves a poor field biomarker of environmental contamination in the present study. The metabolism of the willow has a high rate of biotransformation and pollutants may suffer the translocation to other tissues (Mitton et al. 2012). *Quercus* is a widespread tree which has shown to be a species whose leaves can be used as a good indicator in agricultural and forested areas in Spain (Dominguez-Morueco et al. 2014). The lipid peroxidation of the leaves of Holm oaks (*Quercus rotundifolia*) did show significant differences between the entry point of Cubilar River and the drainage of a rice field site. Holm oaks are evergreen trees making them more likely to accumulate peroxidative damage compared to deciduous species as willow. *Quercus rotundifolia* has been shown to be able to accumulate pollutants in leaf tissues without evident damages (De Nicola et al. 2005). No pesticide residues were found in willow leaves of this area, while mg/kg concentrations of the herbicides oxadiazon and terbuthylazine were detected in Holm oak (*Q. rotundifolia*) leaves collected at a point close to the spillway of a rice field into the Cubilar River (DR) (Rodríguez-Gil et al. 2013).

An organism chronically exposed to a contaminant can undergo oxidative stress (Silva Barni et al. 2014). The lipid peroxidation is an important mechanism implicated in the oxidative damage, so this biomarker is important for ecological risk assessment (Van der Oost et al. 2003; Feito et al. 2012a; Cacciatore et al. 2015). In very few studies, the levels of lipid peroxidation have been evaluated as field-based biomarker and most often the sentinel species chosen have been fishes and bivalves (Table 1). Our study provides valuable information since we evaluate the oxidative damage in a crustacean species, which is known for having high levels of cytochrome P450, important in the conversion of many xenobiotics (Porte and Escartín 1998). On the other hand, the evaluation of oxidative damage is performed in woody species, which may bioaccumulate pollutants (Arena et al. 2013), a characteristic that is frequently exploited for phytoremediation (Mitton et al. 2012) and can also be useful for environmental biomonitoring. The studies about accumulation of pollutants in woody species are still very scarce (Table 1).

We demonstrate in this study that non-target organisms can be affected by diffuse agricultural pollution. Lipid peroxidation can be a suitable field-based biomarker assessing the effects of exposure. This field-based biomarker compensates the deficiency of other methods applied in the same area, since for example microbioassays are not able to integrate the sorption of chemicals to sediments, the chronic effect of a pollutant or the accumulation through food chains. Besides, this field-based biomarker may be a complementary tool in the analysis of environmental pollution and permit validating the results obtained in laboratory bioassays. This verification is important for avoiding an overestimation or underestimation of real effects on natural biota (Van der Oost et al.

2003). Biotic and abiotic factors could interfere in the response of an organism in the field so the results of laboratory bioassays cannot directly extrapolated to the natural environment(Kimball and Levin 1985a; George-Ares and Clark 2000a). Lipid peroxidation and other biomarkers are useful when they can be applied under field conditions and validated by field studies. On the other hand, some contaminants with high temporal variability only can be detected by field-based biomarkers(Thompson et al. 1988; Porte and Escartín 1998). The information generated by the use of this or other field-based biomarkers is useful for management, protection and conservation of natural ecosystems(Lam, P. K. S.; Wu 2003). Nevertheless, further studies are necessary to elucidate the basic biology of the most ecologically relevant taxa, in order to eliminate uncertainties due to physiological effects. Bioassays of toxicity in the animal and plant development and field-based biomarkers may be used together, which would allow for a more successful assessment of the degree of contamination of an agroecosystem.

The use of field-based biomarkers of lipid peroxidation showed that non-target species such as red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and holm oak (*Quercus rotundifolia*) may suffer oxidative damage in response to environmental levels of pollutants. The greatest increase of levels of lipid peroxidation in gills of *P.clarkii* is measured in male crayfish downstream the irrigation area. In leaves of *Q.rotundifolia*, the highest levels are measured in the drainage of a rice field. Both sampling sites demonstrate that there is diffuse agricultural pollution. Variability between the measured levels of lipid peroxidation was observed among organs, sex, length and the degree of pollution in each sampling site. The MDA-gills/MDA-hepatopancreas index allows for the differentiation between reference and polluted sites. Lipid peroxidation in Holm oak leaves can be a suitable field-based biomarker of environmental pollution. The use of field-based biomarkers allows checking that the information obtained in the laboratory by bioassays corresponds to the actual dynamics of pollutants in agroecosystems and the possible effects of these on the biota. It is a complementary tool in the evaluation of environmental pollution and necessary for the protection of agroecosystem. Nevertheless, to improve the use of field-based biomarkers, it would be necessary to perform further studies in order to deepen in the basic biology of the most relevant taxa and establish consistent methodologies to analyze the samples.

Abbreviations

BHT 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol

CGMs Models of oceanic atmospheric circulation

MDA Malondialdehyde

PNR Spanish National Irrigation Plan

POPs Persistent Organic Pollutants ROS Reactive oxygen species

TBA Thiobarbituric acid

TBARS Thioarbituric acid reactive substances

TEP 1,1,3,3-tetramethoxypropane

WFD Water Framework Directive

Authors contributions

The study was designed by J. San Sebastian Sauto and M. Catalá. The sampling and field work was performed by J.L. Rodríguez-Gil, P. Sánchez Sánchez, J. San Sebastián Sauto and M. Catalá. The analysis of the samples was carried out by J.L. Rodríguez-Gil. The article was written by M.R. de las Heras assisted by J.L. Rodríguez-Gil under the direction of M. Catalá. All the authors have read and approved the paper.

Acknowledgments

This work has been funded by SEPI and TRAGSA Group within BIOINRIE 30–13.436 R&D Project. We wish to thank Dr. S. Gonzalez-Alonso for her help during field work and sampling.

References

- Acquaviva R, Vanella L, Sorrenti V, et al (2012) Biochemical modifications in *Pinus pinaster* Ait. as a result of environmental pollution. *Environ Sci Pollut Res Int* 19:3850–8. doi: 10.1007/s11356-012-1030-x
- Al D, Kouba A, Velíšek J (2014) Effect of Chronic Exposure to Prometryne on Oxidative Stress and Antioxidant Response in Red Swamp Crayfish (*Procambarus clarkii*). 2014:1–7.
- Anton A, U TS, Angulo E, Rallo A (2000) The use of two species of crayfish as environmental quality sentinels : the relationship between heavy metal content , cell and tissue biomarkers and physico-chemical characteristics of the environment. *Sci Total Environ* 247:239–251. doi: [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00493-3](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00493-3)
- Arena C, De Maio A, De Nicola F, et al (2013) Assessment of Eco-Physiological Performance of *Quercus ilex* L. Leaves in Urban Area by an Integrated Approach. *Water, Air, Soil Pollut* 225:1824. doi: 10.1007/s11270-013-1824-6
- Arroita M, Causapé J, Comín FA, et al (2013) Irrigation agriculture affects organic matter decomposition in semi-arid terrestrial and aquatic ecosystems. *J Hazard Mater* 263 Part 1:139–145. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.06.049
- Avilés JM, Sánchez JM, Parejo D (2006) Food selection of wintering common cranes (*Grus grus*) in holm oak (*Quercus ilex*) dehesas in south-west Spain in a rainy season. *J Zool* 256:71–79. doi: 10.1017/S0952836902000092
- Bajpai R, Upreti DK (2012) Accumulation and toxic effect of arsenic and other heavy metals in a contaminated area of West Bengal, India, in the lichen *Pyxine coccinea* (Sw.) Nyl. *Ecotoxicol Environ Saf* 83:63–70. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.06.001
- Barbero A (2005) The Spanish National Irrigation Plan.
- Barylá a., Laborde C, Montillet JL, et al (2000) Evaluation of lipid peroxidation as a toxicity bioassay for plants exposed to copper. *Environ Pollut* 109:131–135. doi: 10.1016/S0269-7491(99)00232-8
- Belgers JDM, Van Lieverloo RJ, Van der Pas LJT, Van den Brink PJ (2007) Effects of the herbicide 2,4-D on the growth of nine aquatic macrophytes. *Aquat Bot* 86:260–268. doi: 10.1016/j.aquabot.2006.11.002
- Bermudez GM a, Rodriguez JH, Pignata ML (2009) Comparison of the air pollution biomonitoring ability of three *Tillandsia* species and the lichen *Ramalina celastri* in Argentina. *Environ Res* 109:6–14. doi: 10.1016/j.envres.2008.08.014
- Borković SS, Pavlović SZ, Kovacević TB, et al (2008) Antioxidant defence enzyme activities in hepatopancreas, gills and muscle of Spiny cheek crayfish (*Orconectes limosus*) from the River Danube. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* 147:122–8. doi: 10.1016/j.cbpc.2007.08.006
- Cacciatore LC, Nemirovsky SI, Verrengia Guerrero NR, Cochón AC (2015) Azinphos-methyl and chlorpyrifos, alone or in a binary mixture, produce oxidative stress and lipid peroxidation in the freshwater gastropod *Planorbium corneum*. *Aquat Toxicol* 167:12–19. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.07.009

- Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, et al (2000) The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ* 247:295–311.
- Candela L, Elorza FJ, Jiménez-Martínez J, von Igel W (2012) Global change and agricultural management options for groundwater sustainability. *Comput Electron Agric* 86:120–130. doi: 10.1016/j.compag.2011.12.012
- Cano E, Jiménez a (2003) Efectos de *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (DECAPODA, CAMBARIDAE) sobre las plántulas de arroz y su control usando un surfactante no iónico, en las marismas del Bajo Guadalquivir. *Bol San Veg Plagas* 29:641–648.
- Catala M, Gasulla F, Pradas Del Real AE, et al (2013) The organic air pollutant cumene hydroperoxide interferes with NO antioxidant role in rehydrating lichen. *Environ Pollut* 179:277–284. doi: 10.1016/j.envpol.2013.04.015 [doi]
- Conti ME, Pino A, Botrè F, et al (2009) Lichen *Usnea barbata* as biomonitor of airborne elements deposition in the Province of Tierra del Fuego (southern Patagonia, Argentina). *Ecotoxicol Environ Saf* 72:1082–1089. doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.12.004
- Daam, M. A.; Van den Brink P (2011) Risk Assessment of Agrochemicals on Irrigation Water Quality. XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for people (IHC2010): International Symposium on Climwater 2010: Horticultural Use of Water in a Changing Climate. *Acta Hort* 922:41–47. doi: 10.17660/ActaHortic.2011.922.4.
- Damásio JB, Barata C, Munné A, et al (2007) Comparing the response of biochemical indicators (biomarkers) and biological indices to diagnose the ecological impact of an oil spillage in a Mediterranean river (NE Catalunya, Spain). *Chemosphere* 66:1206–1216. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.07.055
- de Mendiburu F (2015) *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.2-3 <https://cran.r-project.org/package=agricolae>.
- De Nicola F, Maisto G, Prati MV, Alfani A (2005) Temporal variations in PAH concentrations in *Quercus ilex* L. (holm oak) leaves in an urban area. *Chemosphere* 61:432–440. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.01.082
- Desouky MM a, Abdel-Gawad H, Hegazi B (2013) Distribution, fate and histopathological effects of ethion insecticide on selected organs of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Food Chem Toxicol* 52:42–52. doi: 10.1016/j.fct.2012.10.029
- Dix TA, Aikens J (1993) Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem Res Toxicol* 6:18–62.
- Dominguez-Morueco N, Moreno H, Barreno E, et al (2014) Preliminary assessment of terrestrial microalgae isolated from lichens as testing species for environmental monitoring: lichen phycobionts present high sensitivity to environmental micropollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 99:35–44. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.10.007
- Douros DL, Gaines KF, Novak JM (2015) Atrazine and glyphosate dynamics in a lotic ecosystem: the common snapping turtle as a sentinel species. *Environ Monit Assess* 187:114:2–15. doi: 10.1007/s10661-015-4336-6

- Feito R, Valcárcel Y, Catalá M (2012) Biomarker assessment of toxicity with miniaturised bioassays: Diclofenac as a case study. *Ecotoxicology* 21:289–296. doi: 10.1007/s10646-011-0790-2
- Fernandes D, Potrykus J, Morsiani C, et al (2002) The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality in two low-stream rivers (NE Spain). *Environ Res* 90:169–178. doi: 10.1006/enrs.2002.4390
- Fornstrom CB, Landrum PF, Weisskopf CP, La Point T. (1997) Effects of Terbufos on Juvenile Red Swamp Crayfish (*Procambarus clarki*): Differential routes of exposure. *Environ Toxicol Chem* 16:2514–2520.
- Fox J, Weisberg S (2011) *An {R} Companion to Applied Regression* (Second ed.). Thousand Oaks, CA: Sage, <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>.
- George-Ares a, Clark JR (2000) Aquatic toxicity of two Corexit registered dispersants. *Chemosphere* 40:897–906. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00498-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00498-1)
- Gillis PL, Higgins SK, Jorge MB (2014) Evidence of oxidative stress in wild freshwater mussels (*Lasmigona costata*) exposed to urban-derived contaminants. *Ecotoxicol Environ Saf* 102:62–69. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.12.026
- Global Rice Science Partnership (GRiSP) (2013) Rice almanac, 4th edition (Rice in Europe pp 101-102). Los Baños Int. Rice Res. Inst. 101–102.
- Holmqvist N, Stenroth P, Berglund O, et al (2007) Persistent organic pollutants (POP) in a benthic omnivore - A comparison between lake and stream crayfish populations. *Chemosphere* 66:1070–1078. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.06.064
- Kimball KD, Levin S a. (1985) Limitations of Laboratory Bioassays: The Need for Ecosystem-Level Testing. *Bioscience* 35:165–171. doi: 10.2307/1309866
- Klink A, Stankiewicz A, Wisłocka M, Polechońska L (2014) Macro- and microelement distribution in organs of *Glyceria maxima* and biomonitoring applications. *Environ Monit Assess* 186:4057–4065. doi: 10.1007/s10661-014-3680-2
- Lam, P. K. S.; Wu RS (2003) Use of Biomarkers in Environmental Monitoring. Review Submitted to the Scientific and Technical Advisory Panel (STAP) and Global Environment Facility (GEF). STAP Workshop on The Use Bioindic. Biomarkers Anal. Methods Anal. POPs Dev. Ctries, STAP/GEF.
- Lam PKS (2009) Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean Coast Manag* 52:348–354. doi: 10.1016/j.ocecoaman.2009.04.010
- Loureiro TG, Manuel P, Gentil S, et al (2015) Red swamp crayfish : biology, ecology and invasion-an overview. *Nauplius* 23:1–19. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-64972014002214>
- MAGRAMA (2010) Mapa de Cultivos y Aprovechamientos de España 1:50.000 del año 2000-2010. <http://wms.magrama.es/sig/Agricultura/MapaCultivos2000-2010/wms.aspx>.
- Maneein R, Khonsue W, Varanusupakul P, et al (2011) Association between Atrazine Utilization and Biologic Response of Rice Field Crab *Esanthelphusa nani* in Paddy Fields of Nan Province, Thailand. 2-s2.0-80051878055

- Martín-Díaz ML, Blasco J, Sales D, DelValls TA (2004) Biomarkers as tools to assess sediment quality. Laboratory and field surveys. *TrAC - Trends Anal Chem* 23:807–808. doi: 10.1016/j.trac.2004.07.012
- Mishra VK, Upadhyay AR, Tripathi BD (2009) Bioaccumulation of heavy metals and two organochlorine pesticides (DDT and BHC) in crops irrigated with secondary treated waste water. *Environ Monit Assess* 156:99–107. doi: 10.1007/s10661-008-0466-4
- Mitton FM, Gonzalez M, Peña A, Miglioranza KSB (2012) Effects of amendments on soil availability and phytoremediation potential of aged p,p'-DDT, p,p'-DDE and p,p'-DDD residues by willow plants (*Salix* sp.). *J Hazard Mater* 203–204:62–8. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.11.080
- Momot WT. (1995) Redefining the Role of Crayfish in Aquatic Ecosystems. *Rev Fish Sci* 3:33–63.
- Moreno G, Gonzalez-Bornay G, Pulido F, et al (2016) Exploring the causes of high biodiversity of Iberian dehesas: the importance of wood pastures and marginal habitats. *Agrofor Syst* 90:87–105. doi: 10.1007/s10457-015-9817-7
- Nordberg J, Arnér ESJ (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1 1This review is based on the licentiate thesis “Thioredoxin reductase—interactions with the redox active compounds 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and lipoic acid” by Jonas Nordberg,. *Free Radic Biol Med* 31:1287–1312. doi: 10.1016/S0891-5849(01)00724-9
- Ocete, M.E.; Hermosin, M & López A (1984) Anatomía y normas de disección del cangrejo rojo (*Procambarus clarkii*), Editorial. Sevilla(España)
- Persson S, Rotander A, van Bavel B, et al (2013) Influence of age, season, body condition and geographical area on concentrations of chlorinated and brominated contaminants in wild mink (*Neovison vison*) in Sweden. *Chemosphere* 90:1664–1674. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.09.060
- Poch-Massegú R, Jiménez-Martínez J, Wallis KJ, et al (2014) Irrigation return flow and nitrate leaching under different crops and irrigation methods in Western Mediterranean weather conditions. *Agric Water Manag* 134:1–13. doi: 10.1016/j.agwat.2013.11.017
- Porte C, Escartín E (1998) Cytochrome P450 system in the hepatopancreas of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*: a field study. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 121:333–339.
- R Development Core Team (2008) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, <http://www.R-project.org>.
- Reilly CA, Aust SD (2001) Measurement of Lipid Peroxidation. *Current Protocols in Toxicology*. John Wiley & Sons Inc.
- Rikans LE, Hornbrook KR (1997) Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta* 1362:116–127. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4439\(97\)00067-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4439(97)00067-7)

- Rodriguez-Gil JL, San Sebastián Sauto J, González-Alonso S, et al (2013) Development of cost-effective strategies for environmental monitoring of irrigated areas in Mediterranean regions: Traditional and new approaches in a changing world. *Agric Ecosyst Environ* 181:41–49. doi: 10.1016/j.agee.2013.09.007
- Salgueiro-González N, Turnes-Carou I, Besada V, et al (2015) Occurrence, distribution and bioaccumulation of endocrine disrupting compounds in water, sediment and biota samples from a European river basin. *Sci Total Environ* 529:121–130. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.05.048
- Sanchez Lopez, F J; Gil Garcia, M D; Martinez Vidal, Jose L; Aguilera, P A; Garrido Frenich A (2003) ASSESSMENT OF METAL CONTAMINATION IN DOÑANA NATIONAL. *Environ Monit Assess* 93:17–29. doi: 10.1023/B:EMAS.0000016789.13603.e5
- Satya, Upreti DK, Patel DK (2012) *Rinodina sophodes* (Ach.) Massal.: A bioaccumulator of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Kanpur City, India. *Environ Monit Assess* 184:229–238. doi: 10.1007/s10661-011-1962-5
- Schilderman P a, Moonen EJ, Maas LM, et al (1999) Use of crayfish in biomonitoring studies of environmental pollution of the river Meuse. *Ecotoxicol Environ Saf* 44:241–252. doi: 10.1006/eesa.1999.1827
- Silva Barni MF, Gonzalez M, Miglioranza KSB (2014) Assessment of persistent organic pollutants accumulation and lipid peroxidation in two reproductive stages of wild silverside (*Odontesthes bonariensis*). *Ecotoxicol Environ Saf* 99:45–53. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.10.012
- Sojinu OS, Sonibare OO, Ekundayo OO, Zeng EY (2012) Assessment of organochlorine pesticides residues in higher plants from oil exploration areas of Niger Delta, Nigeria. *Sci Total Environ* 433:169–177. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.06.043
- Solé M, Kopecka-Pilarczyk J, Blasco J (2009) Pollution biomarkers in two estuarine invertebrates, *Nereis diversicolor* and *Scrobicularia plana*, from a Marsh ecosystem in SW Spain. *Environ Int* 35:523–531. doi: 10.1016/j.envint.2008.09.013
- Tang Z, Huang Q, Cheng J, et al (2014) Distribution and accumulation of hexachlorobutadiene in soils and terrestrial organisms from an agricultural area, East China. *Ecotoxicol Environ Saf* 108:329–334. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.07.024
- Thompson JE, Froese CD, Madey E, et al (1988) Lipid metabolism during plant senescence. *Prog Lipid Res* 37:119–141.
- Tosti E (2012) Best Biomarker and Bioindicator for Marine Environmental Pollution. *J Mar Sci Res Dev* 02:1–2. doi: 10.4172/2155-9910.1000e101
- Trapp S, Köhler A, Larsen LC, et al (2001) Phytotoxicity of fresh and weathered diesel and gasoline to willow and poplar trees. *J Soils Sediments* 1:71–76. doi: 10.1007/BF02987712
- Trujillo-Jimenez, Patricia; Elias Seden-Diaz, Jacinto; Lopez-Lopez E, Daam MA, Van den Brink P., et al (2001) New microbioassays based on biomarkers are more sensitive to fluvial water micropollution than standard testing methods. *Chemosphere* 35:523–531. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.03.030

- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57–149. doi: 10.1016/S1382-6689(02)00126-6
- Vigo-Pelfrey C (1990) *Membrane Lipid Oxidation*.
- Vioque-Fernández A, Alves de Almeida E, López-Barea J (2009) Assessment of Doñana National Park contamination in *Procambarus clarkii*: integration of conventional biomarkers and proteomic approaches. *Sci Total Environ* 407:1784–97. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.051
- Vranković J, Slavić M (2015) Biomarker responses in *Corbicula fluminea* to the presence of dioxin-like polychlorinated biphenyls and seasonal changes. *Ecol Indic* 48:99–106. doi: 10.1016/j.ecolind.2014.08.005
- Wang K, Jiang Y (2007) Antioxidant responses of creeping bentgrass roots to waterlogging. *Crop Sci* 47:232–238.
- Wei K, Yang J (2015) Oxidative damage induced by copper and beta-cypermethrin in gill of the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicol Environ Saf* 113:446–453. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.12.032
- Winter S, Streit B (1992) Organochlorine compounds in three-step terrestrial food chain. *Chemosphere* 24:1765–1774.
- Xiao X, Han D, Zhu X, et al (2014) Effect of dietary cornstarch levels on growth performance, enzyme activity and hepatopancreas histology of juvenile red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Aquaculture* 426–427:112–119. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.01.029
- Yildirim NC, Yildirim N, Danabas D, Danabas S (2014) Use of acetylcholinesterase, glutathione S-transferase and cytochrome P450 1A1 in *Capoeta umbla* as biomarkers for monitoring of pollution in Uzuncayir Dam Lake (Tunceli, Turkey). *Environ Toxicol Pharmacol* 37:1169–1176. doi: 10.1016/j.etap.2014.04.001
- Zhang G, Pan Z, Bai A, et al (2014) Distribution and bioaccumulation of organochlorine pesticides (OCPs) in food web of Nansi Lake, China. *Environ Monit Assess* 186:2039–2051. doi: 10.1007/s10661-013-3516-5
- Zuur AF, Ieno EN, Elphick CS (2010) A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*. 1(1):3–14. doi: 10.1111/j.2041-210X.2009.00001.x

CAPITULO 2

Biotechnological applications of lichen phycobionts: fast bioassay of environmental toxicity

Rosa de las Heras and Myriam Catalá

SYMBIOSIS 82, 69–78(2020)

Keywords: Biomarkers: Microbioassay, *Asterochloris erici*, Pollutants, Chlorophyll autofluorescence. Free radicals, Microalgae

Abstract

Microbioassays allow for efficient contamination monitoring and control strategies. Free-living microalgae, representative of the aquatic environment, are the most used organisms due to high sensitivity and reproducibility. However, a lack of testing methods representative of terrestrial habitats has long been highlighted. A good unexploited option is the use of lichen phycobionts. The use of appropriate biomarkers leads to a reduction in costs and number of organisms, contributing to cost-efficient, rapid, and sensitive microbioassays. With the aim to develop a fast microbioassay, axenic *Asterochloris erici* was grown on treated cellulose paper, desiccated and rehydrated with different concentrations of inorganic and organic pollutants. Chlorophyll autofluorescence and free radical content were measured 5 min post-rehydration as energetics and oxidative status biomarkers respectively. Fluorescence microscopical images of exposed phycobionts were also collected. Potassium dichromate and copper sulphate decreased chlorophyll autofluorescence at high concentrations whereas boric and clofibric acids had little effect, all showing LOECs similar to those found in the literature. Heavy metals induced free radical bursts at extremely low concentrations whereas boric and clofibric acid showed modest and fluctuant increases. Microscopical images support fluorometric results and relate free radical bursts with bigger cells. In every case, free radicals LOEC is lower than chlorophyll autofluorescence's by at least three orders of magnitude, making this microbioassay highly sensitive and fast, as well as low cost and ecologically relevant.

1. Introduction

The adopted legislative measures have partly contributed to mitigate the risks arising from chemical pollution of water. However, the growing demand and the discovery of new pollutants require the continuous protection of human health and the environment through research (Damià and López 2008). There are compounds that are only partially removed from wastewater treatment plants and are persistent in surface waters (Winkler et al. 2001). For example, boron exists naturally in the form of borates but has increased considerably in the aquatic environment through human activities (Butterwick et al. 1989). Boron is one of the most important contaminants in most coal ash materials (Adriano 2001). It is estimated that 11,800 t are released annually into coal fly ash from coal combustion (Bertine, K.K., Goldberg, E.D. 1971). This is an essential micronutrient for plant growth and its deficiency affects the functioning of several physiological and metabolic processes (Lukaszewski and Blevins 1996). Boron toxicity generally occurs in semi-arid and arid environments, where the level of B is high in the soil or in irrigation water (Nable et al. 1997). High levels of boron are found in domestic wastewater (0.5 to 2 mg/L) in these regions (Polat et al. 2004) while levels in raw water have been reported in the low µg/L range (Health Canada 2020). B is only available to plants in water-soluble forms such as boric acid or borate anions (Shorrocks 1997). Boron has several mechanisms of toxicity in plants, it can disturb the development of the cell wall or the alteration can be metabolic. It can also affect cell development and division and if there are high concentrations in the leaves, an osmotic imbalance can occur (Reid et al. 2004). Increases in reactive oxygen species (ROS) induced by B have been reported in tobacco, tomato and chickpea crops in concentrations range 0.05–64 mM (García et al. 2001; Ardic et al. 2009; Cervilla et al. 2009).

Organic pollutants, as clofibric acid, can bioaccumulate and cause adverse effects in the environment (Filimonova et al. 2016). Its environmental persistence is estimated at more than 21 years (Emblidge and DeLorenzo 2006) water residence time is 1–2 years (Zuccato et al. 2000). Concentrations as high as 7300 ng/L have been reported in groundwater samples (Heberer et al. 1995). In river waters concentrations higher than 0.001 mg/L have been found (Stumpf et al. 1999). It is the active metabolite of clofibrate, one of the first compounds that was used as a lipid regulator (Kümmerer 2008). Additionally, (R) -mecoprop is a structural isomer of clofibric acid used as a herbicide in cereal crops (Buser et al. 1998). Exposure to high concentrations (0.5, 1.0 and 2.0 mg/L) of clofibric acid increased the activity of antioxidant enzymes in *Typha* species and induced oxidative damage (Dordio et al. 2009).

Heavy metals are within the most frequent non-biodegradable pollutants reported to be highly concentrated (Mallick, N; Rai 2002). Besides the fact that chromium appears naturally, it is also released into the environment by industrial processes (Bluskov et al. 2005). Hexavalent chromium is harmful to wildlife for concentrations higher than 0.05 ppm (Khalil et al. 1998) and carcinogenic to humans (Caravelli et al. 2008). Environmental levels in freshwater range 0–117 µg/L (mean 9.7 µg/L)(Shanker and Venkateswarlu 2011), however levels above 12 mg/L and 550–1500 ppm/L of chromium have been observed in groundwater(Jaishankar et al. 2014). Progressive stages of chlorosis and necrosis have long been detected due to the toxicity of Cr in plants(Hauschild 1993). In crops, when Cr is available in concentrations of 1–5 mg/L, alterations are produced in the metabolic processes (Dube et al. 2003). Gorbi and Corradi (1993) demonstrated that Cr (IV) supplied as potassium dichromate inhibited cell proliferation and coenobium formation in *Scenedesmus acutus*. Copper is an element of widespread use in industry and agriculture (Fernandes and Henriques 1991). Quantities of 1.3–1.6 kg/ha per year of pesticides containing copper sulphate have been documented, frequently used to remove phytoplankton blooms in municipal water supplies (Haughey et al. 2000; He et al. 2005). Copper levels in runoff water can fluctuate between 5 and 200 µg/L (Wu et al. 1996; Sansalone and Buchberger 1997) and WHO has considered environmental concentrations in surface waters to range in the low µg/L range (WHO 2004). Despite, spinach shows a high tolerance to Cu, if treated at high concentrations (around 103 mg/L), it suffers increases in lipid peroxidation products and activities of antioxidant enzymes and decreases in chlorophyll content to some degree (Gong et al. 2019). The effects of copper sulphate on photosynthesis-related gene transcription on cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* were demonstrated (Qian et al. 2010).

The lack of testing organisms representative of terrestrial habitats in microbioassays has long been highlighted (Catala et al. 2009). A good unexploited and unknown option is the use of lichen microalgae(Domínguez-Morueco et al. 2014). These have tolerance to desiccation until rehydration allows them to reset their metabolism (Oliver and Derek Bewley 2010), and are capable of growing outside of symbiosis (Wolseley and Hawksworth 2009). Many species of lichens are associated with the alga *Asterochloris erici* (formerly *Trebouxia erici*) (Skaloud and Peksa 2010) which is sensitive to micropollutants (Domínguez-Morueco et al. 2014), may be obtained in large quantities at low cost and tolerates a wide temperature range. The use of biomarkers in phycobionts may help detect the presence of pollutants in a short period of time and at low cost. The most widely used biomarker to estimate the photosynthetic activity is chlorophyll

autofluorescence. The integrity of the plant chlorophyll may be altered and affect photosynthesis. The yield of chlorophyll autofluorescence depends on the conditions in which the organism is found, if exposed to contaminants or suboptimal temperatures, the fluorescence emission will be lower (Catala et al. 2010). Rehydration of lichen thalli and axenic phycobionts was shown to cause an intracellular burst of free radicals (Catala et al. 2010) derived from reactive oxygen species (ROS) whose intensity is modified in the presence of environmental pollutants (Álvarez et al. 2015).

To comply with current environmental assessment necessities, new microbioassays developed should be cost-efficient, rapid and sensitive. Rapid biomarkers might contribute to this intention. The use of an aero-terrestrial microalga as *Asterochloris erici* could also contribute to microbioassays presenting a great biological and ecological relevance. Therefore, the following objectives are pursued: (1) designing a cost-effective and rapid microbioassay for the detection of pollutants in environmental samples based on the lichen phycobiont *Asterochloris erici*, (2) finding a suitable rapid biomarker of toxicity in this species.

2. Material and methods

2.1. Biological material

An axenic strain of the lichen alga *Asterochloris erici* (formally *Trebouxia erici*, SAG 32.85 = UTEX 911; collection of algae of the University of Texas at Austin, TX, USA) described by Skaloud and Peksa (2010) was used. This phycobiont formerly known as *Trebouxia erici* (Ahmadjian 1993), was isolated from the lichen *Cladonia cristatella* Tüek. The strain was kindly provided by Dr. Gasulla and Dr. Barreno (University of Valencia, BITI, Valencia, Spain).

2.2. Chemicals

Magnesium sulphate heptahydrate, sodium chloride, dipotassium hydrogen phosphate, potassium dihydrogen phosphate, calcium chloride, zinc sulphate heptahydrate, manganese (II) chloride tetrahydrate, molybdenum oxide (VI), copper (II) sulphate pentahydrate, cobaltous nitrate hexahydrate, potassium hydroxide-ethylene diamine tetra—acetic acid solution, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, potassium hydroxide, ferrous sulphate heptahydrate and sulfuric acid for 3 N Bold medium were supplied by Panreac (Barcelona, Spain) with a minimum of purity of 98% except molybdenum oxide (VI) and potassium hydroxide with a purity of 85%. Sodium nitrate and glucose were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) with a minimum purity of 99% and casein was obtained from Fluka Biochemika (San Sebastian Spain) with impurities less than or equal to 3.5% chloride (expressed as sodium chloride). European agar was acquired from Conda-Pronadisa (Valladolid, Spain). The phycobionts were exposed to five different concentrations of the following pollutants in a logarithmic range: potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$, CAS #777850-9) (10^{-6} to 10^5 mg/L), copper sulphate (Cu_2SO_4 , CAS #7758-98-7) (4×10^{-9} to 4×10^5 mg/L), boric acid (H_3BO_3 , CAS #10043-35-3) (10^{-5} to 10^4 mg/L) and clofibric acid ($C_{10}H_{11}ClO_3$, CAS #882-09-7) (5×10^{-5} to 5×10^3 mg/L). Potassium dichromate, copper sulphate and boric acid had a purity of at least 98% and were acquired through Panreac (Barcelona, Spain). Clofibric acid had a purity of 97% and was acquired through Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

2.3. Phycobiont culture

Asterochloris erici was grown on 0.6 cm diameter discs of pure cellulose treated with sulfuric acid which improves its non-stick properties and make it waterproof, commercially available as oven paper (Lanta alimentary trade mark, distributed by ATEMPO FOODPACK SA, Barcelona, Spain). Discs were previously washed in deionized water, autoclaved and oven-dried at 60 °C, laid on semisolid 3 N Bold medium (Harold and Parker 1962) containing 10 g casein hydrolysate, 20 g glucose and 15 g agar per liter (Ahmadjian 1960). An amount of $2,5 \times 10^6$ cells per disc were seeded and the cultures were maintained in a growth chamber at 19 °C under a 12:12 dark/light cycle (lighting conditions $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

2.4. Desiccation and rehydration treatments

The discs were removed from the culture medium after 21 days and were placed in a closed container with silica gel for desiccation in the growth chamber. The microalgae were totally desiccated in less than 60 min. If the rehydration was to be done the same day, desiccated phycobionts were kept at room temperature. If this process was to be done the next day, the desiccated phycobionts were maintained at 4 °C in the same container. For rehydration with the different treatments, the discs with the desiccated phycobionts were deposited in black flat bottom 96-multiwell plates and rehydrated with 100 μL of the toxicant solutions. To obtain a final concentration of 10 μM , 10 μL 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH₂-DA) were added to every sample to analyze free radical production (Álvarez et al. 2015). Five replicates of each concentration were performed. The experimental control was deionized water. After 5 min of rehydration, the chlorophyll autofluorescence and the production of intracellular free radicals were measured.

2.5. Chlorophyll autofluorescence and intracellular free radical production measurement

The chlorophyll autofluorescence and intracellular free radical production as dichlorofluorescein (DCF) fluorescence were measured in a Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader (Izasa Scientific Biotek) with an excitation filter of 485 nm. Emission of chlorophyll autofluorescence was analyzed at λ_{em} 635 nm and DCF fluorescence was measured at λ_{em} 528 nm (Álvarez et al. 2015). Preliminary assays demonstrated that fluorescence increased abruptly for both parameters in the first seconds to attain a steady state from 1 to 15 min. After analysing these biomarkers, the rehydrated phycobionts were cut and observed under the fluorescence microscope. The fluorescence images obtained were treated with ImageJ processing software.

2.6. Statistics

Data are expressed as the mean \pm the standard error of the mean. Five replicates for each treatment were used. The Student t-test was used to determine if there are statistically significant differences between treatments and controls using Rterm (R-UCA packet). In any case it was considered as significant a p value.

3. Results

The phycobionts were rehydrated with potassium dichromate, copper sulphate, boric acid or clofibric acid and fluorescence was recorded after 5 min. LOEC and NOEC were noted for each biomarker.

When analysing the effects of potassium dichromate on chlorophyll autofluorescence, we observe a slight increase at 1 mg/L indicative of hormesis, where the LOEC is set (Fig. 1a). It decreases consistently in the range of $10^2 - 10^5$ mg/L, falling well below controls (<40%) indicating a strong toxicity. Upon rehydration with copper sulphate, values decrease under 80% at 4×10^3 mg/L where LOEC is registered (Fig. 1b), no hormetic effect is observed. In the case of boric acid, values fluctuate slightly below controls, the NOEC and LOEC are recorded at 10^{-1} mg/L and 1 mg/L respectively (Fig. 1c). For clofibric acid, chlorophyll autofluorescence increases above 120% from 5×10^{-1} mg/L. The LOEC is recorded at 5×10 mg/L (Fig. 1d).

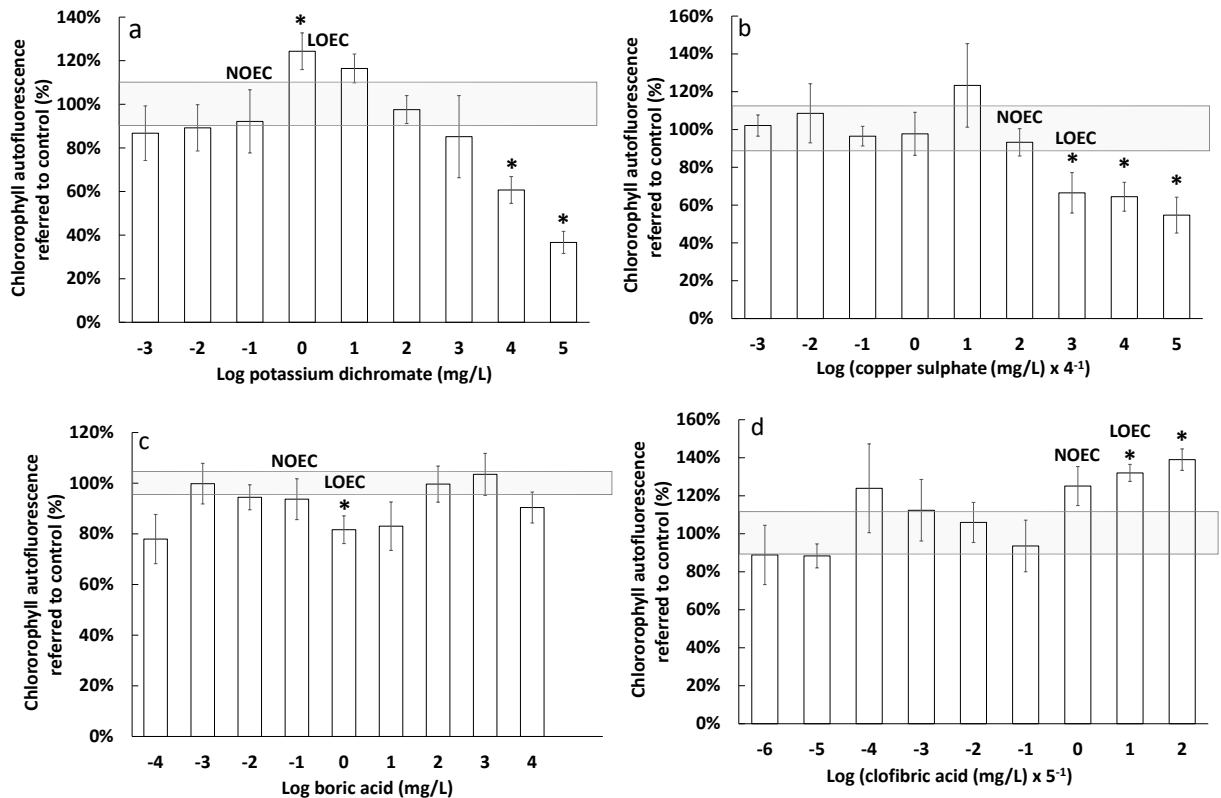


Fig.1 Rehydrated *Asterochloris erici* chlorophyll autofluorescence referred to deionized water controls 5 min post rehydration with different concentrations of: a) potassium dichromate; b) copper sulphate; c) boric acid; d) clofibric acid. The error bars show the standard error of the mean. The solid line frame stands for standard error of controls.

In the rehydrated microalgae, the production of free radicals bursts from 10^{-4} mg/L of potassium dichromate (LOEC), it remains stable in the range of 10^{-2} to 10 mg/L and then increases abruptly again to reach its maximum at the concentration of 10^3 mg/L, then dropping sharply at 10^5 probably indicating a metabolic failure (Fig. 2a). With copper sulphate, a significant increase in the values of free radicals above 200% is observed for very low concentrations of 4×10^{-7} mg/L (LOEC) (Fig. 2b). From this concentration on, the values remain constant up to 4×10^2 mg/L where a peak above 700% is observed, to

decrease very sharply below controls for the successive higher concentrations also likely as a result of a metabolic failure. Regarding boric acid, slight increases in the values of free radicals ranging from 120% to 140%, are observed all along the concentration interval. LOEC and NOEC values are recorded at 10^{-4} mg/L and 10^{-5} mg/L, respectively (Fig. 2c). In the rehydration with clofibric acid, the highest value of free radicals occurs at concentrations of 5×10^2 mg/L. At the next concentration, the value decreases sharply. However, LOEC is already recorded at 5×10^{-4} mg/L at values above 120% (Fig. 2d). LOEC values have been collected in Table 1 showing that free radicals systematically report toxicant effects for concentrations at least 3 orders of magnitude lower than chlorophyll autofluorescence which seems much less sensitive.

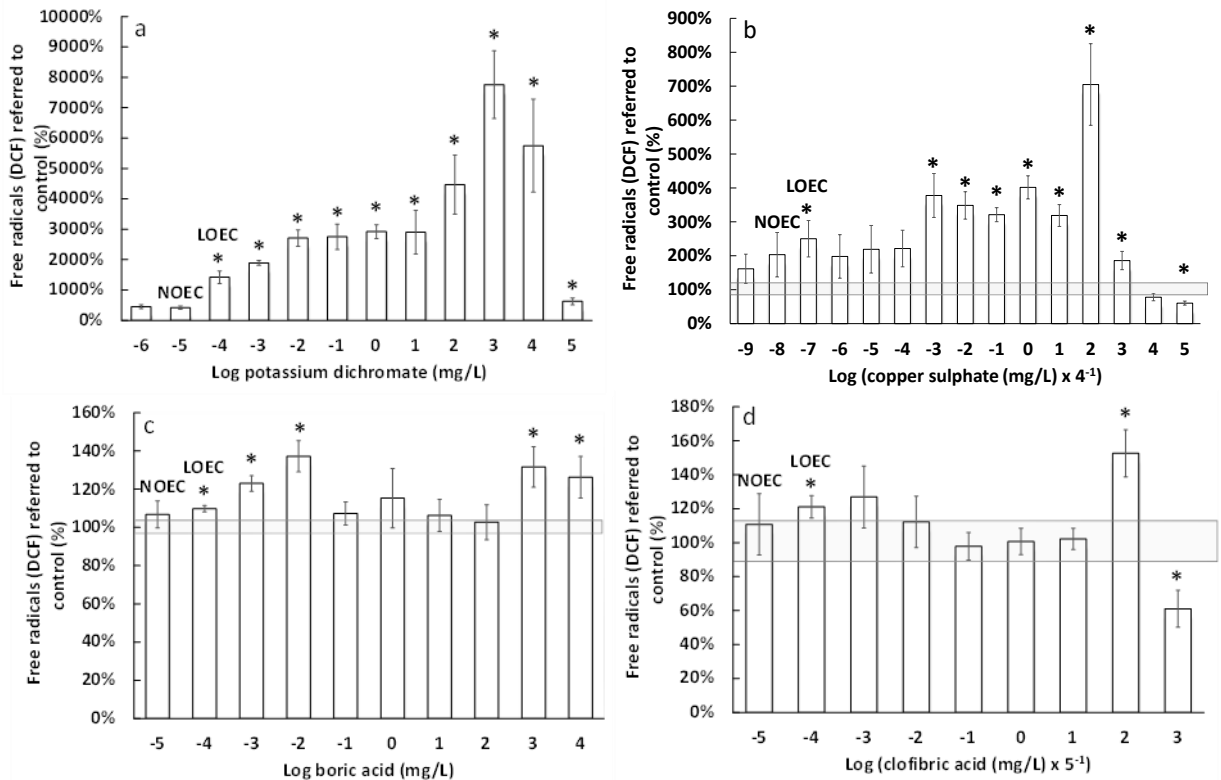


Fig. 2 Rehydrated *Asterochloris erici* free radical levels as DCF fluorescence referred to deionized water controls 5 min post rehydration with different concentrations of: a) potassium dichromate; b) copper sulphate; c) boric acid; d) clofibric acid. The error bars show the standard error of the mean. The solid lane frames the standard error interval of controls.

Table 1: Values of Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) according to each treatment applied and according to each biomarker analysed.

	Potassium dichromate	Copper sulphate	Boric acid	Clofibric acid
LOEC VALUES (mg/L)				
Chlorophyll auto-fluorescence	1	4×10^3	1	5×10
Intracellular free radicals	10^{-4}	4×10^{-7}	10^{-4}	5×10^{-4}

Using fluorescence microscopy, we observed chlorophyll and DCF fluorescence in the algal cells 2–3 h post rehydration. The control corresponds to rehydration with deionized water (Fig.3A, A1 and A2). Chlorophyll autofluorescence of phycobionts rehydrated with potassium dichromate and copper sulphate (Fig. 3B and C respectively), do not differ visibly from the control (Fig. 3B1 and 3C1) but the fluorescence of free radicals is increased for both (Fig. 3B2 and 3C2). Whereas the increase caused by dichromate is more or less homogeneous, in the case of sulphate some phycobionts show clearly more fluorescence than others. The size of *Asterochloris erici* cells is not homogeneous and green fluorescence seems augmented in bigger cells. On the other hand, the fluorescence of chlorophyll is clearly higher than in controls in the case of boric and clofibric acids (Fig 3D1 and 3E1). The fluorescence of free radicals also increases heterogeneously in some cells with respect to the control (Fig. 3D2 and 3E2) but the association with bigger cells is not so evident.

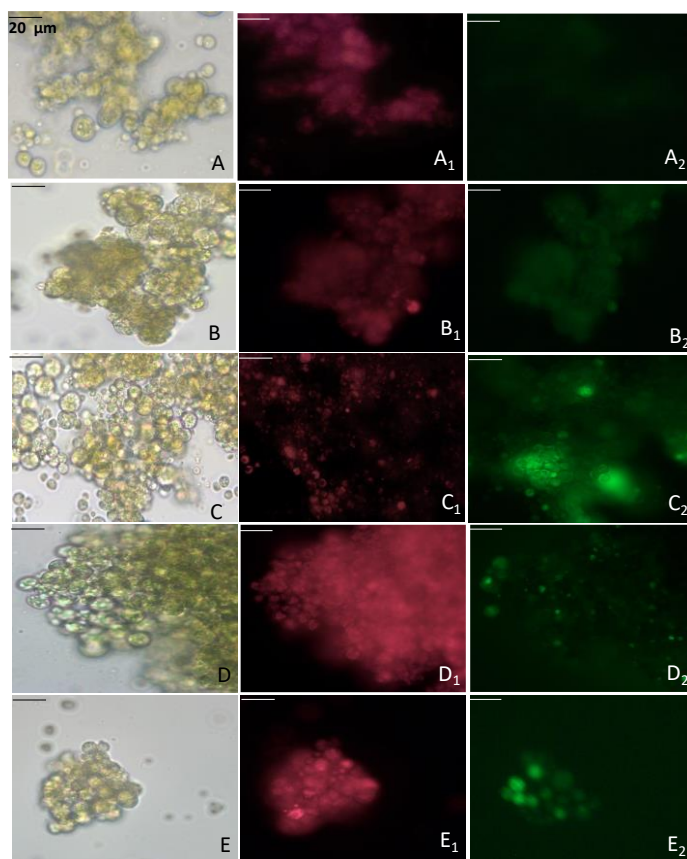


Fig. 3 In vivo fluorescence imaging of the cells of *Asterochloris erici* after rehydration with different treatments (LOEC values) using the fluorescent probe DCFH2 -DA. Red channel, chlorophyll autofluorescence (subscript 1). Green channel, DCF Fluorescence (subscript 2). Capital letters without subscripts are bright field images; A) Control, B) Potassium dichromate, C) Copper sulphate, D) Boric acid and E) Clofibric acid.

4. Discussion

The main environmental regulatory agencies recommend analyzing the viability of algal cultures to determine the effect of pollutants. Despite aquatic microalgae have been frequently used, due to high reproducibility and sensitivity (Shitanda et al. 2009), lichen phycobionts constitute an unexploited option which is highly representative of terrestrial ecosystems (Dominguez-Morueco et al. 2014; Traba et al. 2017). Their use would imply lower costs compared to plant testing and therefore greater efficiency in the control and monitoring of contamination. Among other features, they are available throughout the year, allow easy cultivation in the laboratory and tolerate dehydration (Casano et al. 2011a). Furthermore, the ability of phycobionts to grow on solid surfaces such as nylon (Álvarez et al. 2015) or nitrocellulose (Gasulla et al. 2009), as they would in their natural environment, presents several advantages. These solid surfaces can be handled (including freezing and desiccation), stored, and transported easily, for example for adaptation to portable or field environmental testing kits. In this work we have particularly proven the advantage of using sulphuric acid treated paper, commercially available as oven paper. This support joins the advantages of formerly used materials such as nylon or nitrocellulose with low cost.

The measurement of sublethal biomarkers upon rehydration of axenic phycobionts cultured has allowed us to obtain efficiently massive and very rapid toxicity data. We have not found any literature referring methods that address toxicity during rehydration in other organisms adapted to anhydrobiosis so this is an innovative approach that takes into account relevant biological traits of some eukaryotic organisms likely involved in ecotoxicology and biodiversity loss. Chlorophyll autofluorescence provides us with a biomarker related with chlorophyll integrity and photosynthetic cell energetics (Krause and Weis 1984). Intracellular free radical release relates with oxidative stress and the cell metabolic status. Our results show that substances of different nature render diverse patterns of cellular response dependent on the biomarker chosen. It is noteworthy that LOEC values obtained from the toxicant effect on free radical release occurs at concentrations at least three orders of magnitude lower than effects on chlorophyll autofluorescence demonstrating the sensibility of this parameter.

Data of the toxicity of the chosen pollutants on microalgae are scarce despite their relevance in the environment. The LOEC obtained for potassium dichromate with chlorophyll autofluorescence is in the same order of magnitude to that found in the literature for growth inhibition tests of *Chlorella* (Friis et al. 1998) or *Selenastrum capricornutum* (now *Raphidocelis subcapitata*) (Nyholm et al. 1992). We must highlight that the LOEC is set for a hormetic increase in chlorophyll autofluorescence probably due to compensatory mechanisms. Decreases indicating severe toxicity are observed at higher concentrations (10^4 mg/L). Despite copper sulphate has long been characterized as very toxic to algae, and is commercially used as an effective algicide, the effects on *A. erici* chlorophyll autofluorescence exhibit extremely high LOEC values (4×10^3 mg/L) very far from the $\mu\text{g/L}$ range reported for *Chlorella vulgaris* (Greenfield 1942). In growth inhibition experiments, performed with *Selenastrum capricornutum*, much lower EC_{50} values of 0.0467 mg/L were observed (Nyholm et al. 1992). The phycobiont used in our microbioassay may have some tolerance to the effects of copper. Photobionts have mechanisms for detoxification of heavy metals similar to other microalgae (Bačkor and Fahselt 2008). The effects of prolonged exposure to copper of the photobiont *Asterochloris erici* and the free green algae *Scenedesmus quadricauda* were compared and the photosynthetic apparatus of *Asterochloris erici* was protected more effectively against oxidative stress than in the case of *Scenedesmus quadricauda* (Piovár et al. 2011). The stability of *A. erici* chlorophyll status to transition metal species might be related to the high tolerance of lichens in general to minerals, a necessary evolutive adaptation due to their lack of cuticles or specific protection structures (reviewed in Expósito et al. 2020).

After the rehydration of the phycobionts with boric acid, the chlorophyll autofluorescence does not seem to be affected. A similar tolerance to boron has been also observed for *Chlorella vulgaris* (Chen and Pei 2016). Despite some authors reported that excess boron in plants deteriorates photosynthesis (Sotiropoulos et al. 2002) others found no significant effects (Reid et al. 2004). Clofibric acid does not lead to important decreases in chlorophyll autofluorescence either, in accordance with former studies in plants and aquatic microalgae. Other studies have shown that mecoprop herbicide (structural isomer of clofibric acid) does not exhibit high toxicity on non-target plant species. Kirby and Sheahan (1994) tested the toxicity of the herbicides isoproturon, atrazine and mecoprop on the green algae *Scenedesmus subspicatus*. The herbicides isoproturon and atrazine showed up to 3 orders of magnitude more toxicity than mecoprop. Chronic exposure of

P. subcapitata rendered LOEC values of 150 mg/L for growth inhibition (Ferrari et al. 2003). Here we report a LOEC of 50 mg/L in a very short acute exposure of 5 min which would point to a much higher sensitiveness of the phycobiont *A. erici* to this pharmaceutical compared to aquatic microalgae, reinforcing the idea that diverse organisms must be used in testing methods for higher ecological relevance of results.

When we analyze the suitability of intracellular free radical levels as toxicity biomarker, our microbioassay shows an extraordinary sensitiveness rendering extremely low LOECs, especially compared to chlorophyll autofluorescence. Again, the lack of toxicity data of the pollutants on microalgae limits the discussion of our results. Potassium dichromate produces an intense burst of free radicals to *Asterochloris erici* at very low concentrations, LOEC is found at 10^{-4} mg/L, until the cell diminishes production likely due to serious toxic effects and metabolic failure, coinciding with chlorophyll autofluorescence decline. Hexavalent chromium has been reported to cause a marked oxidative stress finally leading to DNA damage and genotoxicity (Labra et al. 2007). Copper sulphate also induces a rapid and marked increase in free radicals from concentrations as low as 4×10^{-7} mg/L. It is not as intense as in the case of chromium, however, the decrease under control levels indicating a possible metabolic failure, is met at $10^3 - 10^4$ mg/L, also coinciding with chlorophyll autofluorescence decline.

Boric acid induces non dose-dependent slight increases in free radical content that achieve statistical significance at 10^{-4} mg/L. This is in accordance with the increases of lipid peroxidation observed for acute (24 h) exposure of *Chlorella vulgaris* (Chen et al. 2019). Similarly, intracellular free radical content is slightly increased at some concentrations of clofibric acid. In this case, after reaching a maximum at 10^2 mg/L, levels decrease under controls probably indicating a metabolic failure. Interestingly, in this range of concentrations chlorophyll autofluorescence is increased. In the macrophyte *Typha spp.* (cattail) high concentrations of clofibric acid do not seem to affect the photosynthetic pigments but alters antioxidant enzymes activities (Dordio et al. 2009). Zhang et al. (2019) reported differences in cell size of *Chlorella pyrenoidosa* cultures treated with clofibric acid and other human pharmaceuticals. This could be related with the differences in the content of free radicals of the bigger cells observed by fluorescence microscopy, indicating that the sensitiveness of the microalgae may depend upon the physiological state of the culture.

This microbioassay aims to detect the toxicity of a sample in a very rapid, cost-efficient and sensitive way. Other bioassays performed with microalgae have other toxicity endpoints such as growth inhibition or biomass, and therefore require longer times (a minimum of 24 h). We did not get the expected answer by analysing the biomarker of chlorophyll autofluorescence. However, we obtain a very sensitive response analysing the intracellular free radicals although there is not much published literature on microalgae to compare our results. For example, while reported dichromate LOEC for *Chlorella* bioassays are in the high $\mu\text{g/L}$ ($820 \mu\text{g/L}$) (Friis et al. 1998), we obtain LOEC values in the high ng/L range ($10-1 \mu\text{g/L}$) turning our bioassay into a much more sensitive tool able to detect Cr in the low $\mu\text{g/L}$ range reported for freshwater (mean ca. $10 \mu\text{g/L}$) (Shanker and Venkateswarlu 2011). Regarding copper sulphate, the LOEC values ($4 \times 10^{-1} \text{ ng/L}$) are extremely low but difficult to compare with bioassays using *S. capricornutum* ($\text{EC}_{50} 46.7 \mu\text{g/L}$) (Nyholm et al. 1992). In any case, it perfectly suits the

needs for the detection of surface waters reported levels, in the low $\mu\text{g/L}$ range, comparably reducing time and costs (WHO 2004). Boron induces non-dose-dependent free radical increases, a result similar to those obtained after analysis of acute 24 h exposure in *C.vulgaris* (Chen and Pei 2016). The LOEC value (10^{-1} $\mu\text{g/L}$) obtained is very low in relation to the range found in domestic wastewater (0.5 to 2 mg/L) (Polat et al. 2004) and even in environmental raw water assessment (low $\mu\text{g/L}$) (Health Canada 2020). In the same way, with clofibric acid, very low values of LOEC are obtained (5×10^{-4} mg/L) compared to those reported in *P. subcapitata* (150 mg/L) (Ferrari et al. 2003). This low LOEC value indicates that this microbioassay could detect levels of this pharmaceutical in river waters with concentrations above 10^{-3} mg/L.

Our microbioassay is not only highly sensitive and fast, but also comes to satisfy the need for efficient environmental monitoring of terrestrial ecosystems (Domínguez-Morueco et al. 2014). Furthermore, thanks to this microbioassay, it would be possible to develop a user-friendly kit to evaluate in situ the toxicity of a sample. Given the standard excitation and emission wavelengths of both biomarkers used, they can be measured in standard fluorometers and even in portable fluorometers. Environmental waters, soil leachates and even air sample water extractions can be assessed. The results of our rapid microbioassay, which takes 5 min, presents advantages compared standardized protocols such as Microtox®, *Vibrio fischeri*'s bioluminescent bacterial bioassay, with contact times from 5 to 15 min (Sandín-España et al. 2013) whose biological and ecological relevance is controversial regarding eukaryotes.

5. Conclusions

The rapid microbioassay using the phycobiont *A. erici* developed in this work shows great advantages. This aero-terrestrial microalga isolated from lichens is representative of terrestrial ecosystems, which unlike aquatic systems, are in urgent need for cost-efficient massive testing methods. Our results suggest that the impact of certain pollutants may be very different on aquatic and aero-terrestrial microalgae, while the former seem more sensitive to heavy metals, the latter are affected in a greater deal by clofibric acid. The culture of the cells on treated paper, besides being a biologically relevant presentation of this organism, allows easy manipulation and transport for laboratory or in situ testing. Especially after dehydration. Both biomarkers used provide relevant information about toxicity, however, free radical content reported by DCFH₂-DA is several orders of magnitude more sensitive than chlorophyll autofluorescence. The standard excitation and emission wavelengths allow adaptation to most fluorometers, even portable devices.

Acknowledgments

The authors thank to Paula Herrero Garretas for her great help in the experimental part and the Spanish Ministry of Education and Science (MINECO CGL2012-40058-C02-01 / 02), FEDER and the Generalitat Valenciana (PROMETEOII 021/2013 GVA and PROMETEO / 2017/039) for the financial support. A deep and especial thanks to Prof. Eva Barreno for her intelligent advice and reliable support in the basic and applied investigation on lichens and phycobionts that made this research possible.

Author's contributions

The study was designed by MC. The experiments were performed by MRH. Both authors wrote and revised the texts

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

DCFH-DA2, Dichlorodihydrofluorescein diacetate; DCF, Dichlorofluorescein; LOEC, Lowest Observed Effect Concentration; NOEC, No Observed Effect Concentration; ROS, Reactive oxygen species

References

- Adriano DC (2001) Trace Elements in Terrestrial Environments. Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals, Second ed. New York, USA
- Ahmadjian V (1993) The Lichen Symbiosis. In: Chichester: John Wiley & Sons (ed).
- Álvarez R, del Hoyo A, Díaz-Rodríguez C, et al (2015) Lichen Rehydration in Heavy Metal-Polluted Environments: Pb Modulates the Oxidative Response of Both *Ramalina farinacea* Thalli and Its Isolated Microalgae. *Microb Ecol* 69:698–709. doi: 10.1007/s00248-014-0524-0
- Ardic M, Sekmen AH, Turkan I, et al (2009) The effects of boron toxicity on root antioxidant systems of two chickpea (*Cicer arietinum L.*) cultivars. *Plant Soil* 314:99–108. doi: 10.1007/s11104-008-9709-y
- Báčkor M, Fahselt D (2008) Lichen photobionts and metal toxicity. *Symbiosis* 46:1–10.
- Bertine, K.K., Goldberg, E.D. 1971. (1971) Fossil fuel combustion and the major sedimentary cycle. *Science* (80-) 173:233–235.
- Bluskov S, Arocena JM, Omotoso OO, Young JP (2005) Uptake, distribution, and speciation of chromium in *Brassica Juncea*. *Int J Phytoremediation*. doi: 10.1080/16226510590950441
- Buser HR, Müller MD, Theobald N (1998) Occurrence of the pharmaceutical drug clofibric acid and the herbicide mecoprop in various Swiss Lakes and in the North Sea. *Environ Sci Technol* 32:188–192. doi: 10.1021/es9705811
- Butterwick L, de Oude N, Raymond K (1989) Safety assessment of boron in aquatic and terrestrial environments. *Ecotoxicol Environ Saf* 17:339–371. doi: 10.1016/0147-6513(89)90055-9
- Caravelli AH, Giannuzzi L, Zaritzky NE (2008) Reduction of hexavalent chromium by *Sphaerotilus natans* a filamentous micro-organism present in activated sludges. *J Hazard Mater* 156:214–222. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.12.014
- Casano LM, del Campo EM, Garcia-Breijo FJ, et al (2011) Two *Trebouxia* algae with different physiological performances are ever-present in lichen thalli of *Ramalina farinacea*. Coexistence versus competition? *Environ Microbiol* 13:806–818. doi:

- 10.1111/j.1462-2920.2010.02386.x; 10.1111/j.1462-2920.2010.02386.x
- Catala M, Esteban M, Rodríguez-Gil J-L, Quintanilla LG (2009) Development of a naturally miniaturised testing method based on the mitochondrial activity of fern spores: a new higher plant bioassay. *Chemosphere* 77:983–8. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.07.080
- Catala M, Gasulla F, Pradas del R, et al (2010) Fungal-associated NO is involved in the regulation of oxidative stress during rehydration in lichen symbiosis. *BMC Microbiol* 10:297. doi: 10.1186/1471-2180-10-297
- Cervilla LM, Rosales MA, Rubio-Wilhelmi MM, et al (2009) Involvement of lignification and membrane permeability in the tomato root response to boron toxicity. *Plant Sci* 176:545–552. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.01.008
- Chen X, Pei Y (2016) Effects of sodium pentaborate pentahydrate exposure on *Chlorella vulgaris* growth, chlorophyll content, and enzyme activities. *Ecotoxicol Environ Saf* 132:353–359. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.06.024
- Chen X, Su L, Yin X, Pei Y (2019) Responses of *Chlorella vulgaris* exposed to boron: Mechanisms of toxicity assessed by multiple endpoints. *Environ Toxicol Pharmacol* 70:103208. doi: 10.1016/j.etap.2019.103208
- Damià L, López MJ (2008) Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Panel científico técnico Seguim la política del agua *Jorn Present Result* 1–27. doi: 10.1109/TGRS.2011.2120615
- Dominguez-Morueco N, Moreno H, Barreno E, et al (2014) Preliminary assessment of terrestrial microalgae isolated from lichens as testing species for environmental monitoring: lichen phycobionts present high sensitivity to environmental micropollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 99:35–44. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.10.007
- Dordio A V., Duarte C, Barreiros M, et al (2009) Toxicity and removal efficiency of pharmaceutical metabolite clofibrac acid by *Typha spp.* - Potential use for phytoremediation? *Bioresour Technol* 100:1156–1161. doi: 10.1016/j.biortech.2008.08.034
- Dube BK, Tewari K, Chatterjee J, Chatterjee C (2003) Excess chromium alters uptake and translocation of certain nutrients in *Citrullus*. *Chemosphere*. doi: 10.1016/S0045-6535(03)00570-8
- Emblidge JP, DeLorenzo ME (2006) Preliminary risk assessment of the lipid-regulating pharmaceutical clofibrac acid, for three estuarine species. *Environ Res* 100:216–226. doi: 10.1016/j.envres.2005.03.014
- Expósito JR, Barreno E, Catalá M (2020) Biological Strategies of Lichen Symbionts to the Toxicity of Lead (Pb).
- Fernandes JC, Henriques FS (1991) Biochemical, Physiological, and Structural Effects of Excess Copper in Plants. *Bot Rev* 57:246–273.
- Ferrari B, Paxéus N, Giudice R Lo, et al (2003) Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicol Environ Saf* 55:359–370. doi: 10.1016/S0147-6513(02)00082-9

- Filimonova V, Gonçalves F, Marques JC, et al (2016) Fatty acid profiling as bioindicator of chemical stress in marine organisms: A review. *Ecol Indic* 67:657–672. doi: 10.1016/j.ecolind.2016.03.044
- Friis JC, Holm C, Halling-Sørensen B (1998) Evaluation of elemental composition of algal biomass as toxicological endpoint. *Chemosphere* 37:2665–2676. doi: 10.1016/S0045-6535(98)00153-2
- García P, Rivero R, López-Lefebvre L, et al (2001) Response of oxidative metabolism to the application of carbendazim plus boron in tobacco. *Aust J Plant Physiol* 28:801–806.
- Gasulla F, De Nova PG, Esteban-Carrasco A, et al (2009) Dehydration rate and time of desiccation affect recovery of the lichenic algae *Trebouxia erici*: Alternative and classical protective mechanisms. *Planta* 231:195–208. doi: 10.1007/s00425-009-1019-y
- Gong Q, Wang L, Dai T, et al (2019) Effects of copper on the growth, antioxidant enzymes and photosynthesis of spinach seedlings. *Ecotoxicol Environ Saf*. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.01.016
- Gorbi G, Corradi MG (1993) Chromium Toxicity on Two Linked Trophic Levels I. Effects of Contaminated Algae on *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 25:64–71.
- Greenfield SS (1942) Inhibitory Effects of Inorganic Compounds on Photosynthesis in *Chlorella*. *Am J Bot* 29:121–131.
- Haughey MA, Anderson MA, Whitney RD, et al (2000) Forms and fate of Cu in a source drinking water reservoir following CuSO₄ treatment. *Water Res* 34:3440–3452. doi: 10.1016/S0043-1354(00)00054-3
- Hauschild MZ (1993) Putrescine (1,4-diaminobutane) as an indicator of pollution-induced stress in higher plants: Barley and rape stressed with Cr(III) or Cr(VI). *Ecotoxicol Environ Saf*. doi: 10.1006/eesa.1993.1052
- He ZL, Yang XE, Stoffella PJ (2005) Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J Trace Elem Med Biol* 19:125–140. doi: 10.1016/j.jtemb.2005.02.010
- Health Canada (2020) Boron in Drinking Water Guideline Technical Document.
- Heberer T, Butz S, Stan HJ (1995) Analysis of phenoxy-carboxylic acids and other acidic compounds in tap, ground, surface and sewage water at the low ng/l level. *Int J Environ Anal Chem* 58:43–53. doi: 10.1080/03067319508033111
- Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, et al (2014) Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol* 7:60–72. doi: 10.2478/intox-2014-0009
- Khalil LB, Mourad WE, Rophael MW (1998) Photocatalytic reduction of environmental pollutant Cr(VI) over some semiconductors under UV/visible light illumination. *Appl Catal B Environ* 17:267–273. doi: 10.1016/S0926-3373(98)00020-4
- Kirby MF, Sheahan DA (1994) Effects of atrazine, isoproturon, and mecoprop on the

- macrophyte *Lemna minor* and the alga *Scenedesmus subspicatus*. Bull Environ Contam Toxicol 53:120–126. doi: 10.1007/BF00205148
- Krause GH, Weis E (1984) Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology - II. Interpretation of fluorescence signals. Photosynth. Res.
- Kümmerer K (2008) Pharmaceuticals in the Environment Sources, Fate, Effects and Risks, 1. Evangel. New York
- Labra M, Bernasconi M, Grassi F, et al (2007) Toxic and genotoxic effects of potassium dichromate in *Pseudokirchneriella subcapitata* detected by microscopy and AFLP marker analysis. Aquat Bot. doi: 10.1016/j.aquabot.2006.10.006
- Lukaszewski KM, Blevins DG (1996) Root growth inhibition in boron-deficient or aluminum-stressed squash may be a result of impaired ascorbate metabolism. Plant Physiol 112:1135–1140. doi: 10.1104/pp.112.3.1135
- Mallick, N; Rai L. (2002) Physiological Responses of Vascular Plants to Heavy Metals, Kluwer. The Netherlands
- Nable RO, Ba GS, Paull JG (1997) Boron toxicity. 181–198.
- Nyholm N, Sørensen PS, Kusk KO, Christensen ER (1992) Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ Toxicol Chem 11:157–167. doi: 10.1002/etc.5620110204
- Oliver MJ, Derek Bewley J (2010) Desiccation-Tolerance of Plant Tissues: A Mechanistic Overview. Horticult Rev (Am Soc Horticult Sci) 171–213. doi: 10.1002/9780470650608.ch3
- Piovár J, Stavrou E, Kaduková J, et al (2011) Influence of long-term exposure to copper on the lichen photobiont *Trebouxia erici* and the free-living algae *Scenedesmus quadricauda*. Plant Growth Regul 63:81–88. doi: 10.1007/s10725-010-9515-4
- Polat H, Vengoshb A, Pankratovb I, Polat M (2004) A new methodology for removal of boron from coal and fly ash. Desalination 164:173–188. doi: 10.1016/S0011-9164(04)00176-6
- Qian H, Yu S, Sun Z, et al (2010) Effects of copper sulfate, hydrogen peroxide and N-phenyl-2-naphthylamine on oxidative stress and the expression of genes involved in photosynthesis and microcystin disposition in *Microcystis aeruginosa*. Aquat Toxicol 99:405–412. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.05.018
- Reid RJ, Hayes JE, Post A, et al (2004) A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants. Plant, Cell Environ. doi: 10.1111/j.1365-3040.2004.01243.x
- Sandín-España P, Sevilla-Morán B, Calvo L, et al (2013) Photochemical behavior of alloxidim herbicide in environmental waters. Structural elucidation and toxicity of degradation products. Microchem J 106:212–219. doi: 10.1016/j.microc.2012.07.003
- Sansalone JJ, Buchberger SG (1997) Characterization of solid and metal element distributions in urban highway stormwater. Water Sci Technol 36:155–160. doi: 10.1016/S0273-1223(97)00605-7
- Shanker AK, Venkateswarlu B (2011) Chromium: Environmental Pollution, Health Effects and Mode of Action. Encycl Environ Heal 650–659. doi: 10.1016/B978-0-

- Shitanda I, Takamatsu S, Watanabe K, Itagaki M (2009) Amperometric screen-printed algal biosensor with flow injection analysis system for detection of environmental toxic compounds. *Electrochim Acta* 54:4933–4936. doi: 10.1016/j.electacta.2009.04.005
- Shorrocks VM (1997) The occurrence and correction of boron deficiency. *Plant Soil* 193:121–148. doi: 10.1007/978-94-011-5580-9_9
- Skaloud P, Peksa O (2010) Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*). *Mol Phylogenet Evol* 54:36–46. doi: 10.1016/j.ympev.2009.09.035
- Sotiropoulos TE, Therios IN, Dimassi KN, et al (2002) Nutritional status, growth, CO₂ assimilation, and leaf anatomical responses in two kiwifruit species under boron toxicity. *J Plant Nutr.* doi: 10.1081/PLN-120004386
- Stumpf M, Ternes TA, Wilken RD, et al (1999) Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci Total Environ* 225:135–141. doi: 10.1016/S0048-9697(98)00339-8
- Traba HM, Domínguez-Morueco N, Barreno E, Catalá M (2017) Lichen microalgae are sensitive to environmental concentrations of atrazine. *J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes* 52:223–228. doi: 10.1080/03601234.2016.1270679
- WHO (2004) Copper in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.
- Winkler M, Lawrence JR, Neu TR (2001) Selective degradation of ibuprofen and clofibrac acid in two model river biofilm systems. *Water Res* 35:3197–3205. doi: 10.1016/S0043-1354(01)00026-4
- Wolseley PA, Hawksworth DL (2009) Adaptations of lichens to conditions in tropical forests of South-East Asia and their taxonomic implications. *Blumea J Plant Taxon Plant Geogr* 54:29–32. doi: 10.3767/000651909X475464
- Wu JS., Holman RE., Dorney JR (1996) SYSTEMATIC EVALUATION OF POLLUTANT REMOVAL BY URBAN WET DETENTION PONDS. *J Environ Eng* 983–988.
- Zhang Y, Guo J, Yao T, et al (2019) The influence of four pharmaceuticals on *Chlorellapyrenoidosa* culture. *Sci Rep* 9:1–10. doi: 10.1038/s41598-018-36609-4
- Zuccato E, Calamari D, Natangelo M, Fanelli R (2000) Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 355:1789–1790. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02270-4

CAPITULO 3

“Análisis metabólico de la huella molecular global en el infrarojo cercano (NIRS) de la deshidratación-rehidratación de la microalga simbiótica *Asterochloris erici* y aquafotómica”

Rosa de las Heras, Myriam Catalá, Eva Barreno

(manuscrito en preparación)

Resumen

Los líquenes pueden sobrevivir en un estado de deshidratación (anhydrobiosis), con niveles muy bajos de actividad metabólica. Se ha avanzado muy poco en el conocimiento de la tolerancia a la deshidratación en los líquenes. La técnica FT-NIRS permite el análisis del estado metabólico de las células, proporcionando una huella dactilar molecular única y permite asociar cambios metabólicos con situaciones de estrés. Utilizar esta técnica junto con la aquafotómica permite analizar en profundidad la estructura del agua y su papel en los sistemas biológicos. Para evaluar estos cambios, se obtuvieron los espectros de *Asterochloris erici* a lo largo del proceso de deshidratación y tras la rehidratación. Al analizar la pérdida de agua, se alcanza un RWC de 16% a los 180 minutos que se mantiene estable. Al comparar el espectro de las algas frescas con las algas deshidratadas 24 horas, éstas últimas tenían mayor absorbancia de lípidos saturados y proteínas, metabolitos importantes para mantener las moléculas y la membrana. Por otro lado, las algas rehidratadas durante 24 horas con agua desionizada mostraban pocas diferencias con respecto a las algas frescas, con mayor absorción de aminos y proteínas. No existía diferencias apreciables entre los espectros de algas frescas y rehidratadas 48 horas. Según avanza la deshidratación, disminuyen las moléculas de agua libre y aumentan las moléculas con puentes de hidrógeno. El descenso brusco de las moléculas de agua libre a los 100 minutos y el aumento de las moléculas con 1 puente de hidrógeno parece indicar la preparación para la anhydrobiosis. El estudio de las moléculas de agua nos facilita comprender los mecanismos de tolerancia a la deshidratación.

Introducción

Los líquenes ocupan hábitats donde existe poca disponibilidad de agua puesto que son tolerantes a la desecación. Los líquenes son organismos poiquilohídricos por lo que estos y sus ficobiontes asociados no pueden regular su contenido en agua y dependen de la que exista en el medio para su hidratación. Durante finales del siglo XX y principios del siglo XXI, la mayoría de los estudios se centraban en las respuestas fisiológicas al estrés oxidativo producido por la deshidratación en los líquenes, puesto que una sobreproducción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede ocasionar considerables daños celulares al atacar los ácidos nucleicos, los lípidos y las proteínas (Kramer et al. 2004). Durante la última década, se ha avanzado en el conocimiento de la tolerancia a la deshidratación en los líquenes. Durante la deshidratación, algunas de estas estrategias son los cambios en la composición de la membrana lipídica, cambios en los polímeros extracelulares, remodelación de la pared celular, vitrificación del citoplasma, etc (Knowles and Castenholz 2008; Casano et al. 2011b; Gasulla et al. 2019; González-Hourcade et al. 2020; Candotto Carniel et al. 2021; Vingiani et al. 2021). Las acuaporinas serían otro componente que también intervendría en la deshidratación de líquenes y se empiezan a conocer las distintas vías de señalización molecular que están detrás de la rápida respuesta de los líquenes a la deshidratación (Gasulla et al. 2021). El ficobionte *Asterochloris erici* está asociado a muchas especies de líquenes [referencia]. Está muy bien caracterizado y es muy sensible a los microcontaminantes (Domínguez-Morueco et al. 2014). Puede sobrevivir a la deshidratación rápida con una alta capacidad de recuperación (Del Hoyo et al. 2011) Durante los últimos 30 años, la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) se ha utilizado en los campos de la alimentación y la farmacia. También se ha utilizado en evaluaciones del riesgo ambiental, para distinguir entre zonas contaminadas y no contaminadas, estudiar las alteraciones fisiológicas de talos de líquenes expuestos a contaminantes y determinar el efecto tóxico de contaminantes atmosféricos en los árboles (Garty et al. 1997; Gäb et al. 2006; Casale et al. 2015). Esta técnica supone un método rápido, preciso y no invasivo para el análisis cualitativo y cuantitativo en diferentes campos (agricultura, alimentación, la industria química y la relacionada con el aceite) (P. Williams 1987; Hayes et al. 1993; Larrechi and Callao 2003; Cen and He 2007; Roggo et al. 2007b) y permite el análisis del estado metabólico de las células mediante una huella molecular global tan identificativa y específica como una huella dactilar (Takahashi et al. 2011; Gurbanov y Unal 2018).

La "acuafotómica" es una nueva disciplina que utiliza la interacción agua-luz para explorar la estructura del agua, como sistema compuesto por muchas conformaciones moleculares diferentes del agua, lo que da lugar a diferentes funcionalidades (Tsenkova 2009b). Se utiliza la interacción agua-luz en todas las frecuencias del espectro electromagnético para llegar a una mejor comprensión general de la funcionalidad del agua. La mayoría de los trabajos de acuafotómica se han realizado hasta ahora utilizando la espectroscopia del infrarrojo cercano (NIR), especialmente en el área del primer sobretono de la banda de estiramiento del OH (1.300-1.600 nm), donde se identifican muchas bandas de absorbancia del agua (Mathias Weber et al. 2001; Smith et al. 2005; Tsenkova 2009b; Tsenkova et al. 2015). La acuafotómica se basa en que todo sistema acuoso es una disposición dinámica de la red molecular del agua unida por enlaces de hidrógeno a otros componentes y con alta sensibilidad a las perturbaciones. Si en el

sistema acuoso se produce cualquier perturbación se producen cambios en las moléculas de agua, lo que a su vez produce cambios en las respectivas bandas de absorbancia del agua en los espectros NIRS. Es decir, el agua cambia su patrón de absorbancia según se adapta a una alteración química o física, producida en el propio sistema o en el entorno (Tsenkova 2008c). Mediante esta cualidad del agua, se pueden medir cantidades pequeñas o alteraciones estructurales de otras moléculas que también estén en el sistema acuoso (Tsenkova 2008b, 2007, 2009a). De esta manera, se pueden cuantificar incluso componentes que no absorben en la luz del infrarrojo cercano (Grant et al. 1989; Tsenkova 2009b; Gowen et al. 2015). Gracias a esta técnica, la NIRS se puede aplicar exitosamente para determinar bajas concentraciones de proteínas (Tsenkova 2008a) o glúcidos (Cui et al. 2017) y para monitorizar la calidad del agua (Kovacs et al. 2015). En todos los sistemas acuosos, cada molécula de un componente se solvata con multitud de moléculas de agua, que se reorganizan y se adaptan a su estructura, creando diversas especies moleculares de agua que pueden observarse según sus respectivas bandas de absorbancia. El agua actúa también como amplificador dado que muchas moléculas de agua intervienen en la esfera de solvatación de una sola molécula del soluto. En la acuafotómica, no se mide directamente un soluto sino que la información sobre su concentración se obtiene de manera indirecta midiendo los cambios en las siempre abundantes moléculas de disolvente, lo que mejora la detección y cuantificación de la técnica NIRS (Muncan and Tsenkova 2019). Las especies específicas de agua, como las moléculas de agua libre, los dímeros y otras, contribuyen al espectro de agua de forma muy distinta (Tsenkova 2009a).

Se han realizado investigaciones del estrés abiótico y biótico que sufren las plantas y el papel que tiene el agua en ello (Kuroki et al. 2019). Se ha demostrado que se producen cambios en la estructura del agua en las hojas de la soja después de una infección por el virus del tabaco e incluso también se ha comprobado la habilidad de mantener la estructura de agua libre como indicativo de la tolerancia de las plantas de soja al frío (Jinendra et al. 2010; Jinendra 2011). Poco se ha investigado sobre la dinámica de la estructura de las moléculas de agua en las plantas durante los procesos de deshidratación y rehidratación (Kuroki et al. 2019) y la bibliografía es nula en microalgas.

El análisis de los cambios metabólicos producidos por el estrés con una herramienta precisa, rápida y no invasiva, como la NIRS, permitiría avanzar con eficacia en el conocimiento. Aplicando la técnica de la acuafotómica, podríamos analizar con mayor detalle la tolerancia de los líquenes y sus ficobiontes a la deshidratación y su respuesta ante las perturbaciones ambientales. Con el fin de conocer la huella molecular global del alga líquénica aeroterrestre *Asterochloris erici* y la acuafotómica de su proceso de deshidratación-rehidratación se plantean los siguientes objetivos específicos: a) obtención de la huella molecular global NIRS de las *A. erici* frescas, b) durante la deshidratación, y c) la rehidratación, así como el d) análisis de la dinámica del agua por acuafotómica.

Materiales y métodos

Material biológico

Se utilizó una cepa axénica del alga líquénica *Asterochloris erici* (SAG 32.85 = UTEX 911; colección de algas de la Universidad de Texas en Austin, TX, EE.UU.) descrita por

Skaloud y Peksa (2010). Este ficobionte antes conocido como *Trebouxia erici* (Ahmadjian 1993), fue aislado del líquen *Cladonia cristatella* Tüek. La cepa fue proporcionada por la Dra. Barreno (Universidad de Valencia, BITI, Valencia, España).

Asterochloris erici se cultivó en un medio semisólido 3N Bold (Harold y Parker 1962) que contenía 10 g de caseína hidrolizada y 20 g de glucosa por litro (Ahmadjian 1960). Se sembraron $12,5 \times 10^6$ células por placa Petri y los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 19°C bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 (condiciones de iluminación $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 21 días.

Procedimiento de deshidratación-rehidratación

Los ficobiontes se recogieron del medio de cultivo después de 21 días y se depositaron sobre discos de celulosa tratada químicamente con ácido sulfúrico (comercializado como papel de horno de marca comercial ATEMPO FOODPACK SA) previamente tarados. Tras pesar la biomasa de ficobionte, se analizaron seis réplicas de cada muestra consistentes en 6 discos depositados sobre sendas placas de Petri.

Se deshidrataron los ficobiontes mediante dos procedimientos distintos. En el primero, los discos en sus placas de Petri se colocaron en un recipiente hermético con gel de sílice. El recipiente se guardó en la cámara con las condiciones especificadas en la sección anterior. Las microalgas se pesaron y se tomó un espectro NIRS cada 20 min durante el proceso de deshidratación (200 min). Los ficobiontes se mantuvieron en las condiciones de deshidratación durante 48 h, tomándose el peso y el espectro también a las 24 h y al final del experimento.

En el segundo procedimiento los discos con los ficobiontes se congelaron a -80°C y se liofilizaron (Noxair, Liobench 55) durante 24 horas, tras lo que se pesó cada una de las réplicas y se tomó su espectro.

Los ficobiontes deshidratados (depositados en sus correspondientes discos y estos dentro de placas Petri abiertas) se colocaron encima de papeles de filtro empapados con agua desionizada, dentro de un recipiente hermético durante 24 y 48 h y se mantuvo en la cámara de crecimiento.

Medición del contenido relativo de agua (RWC)

El contenido relativo de agua fue medido en los ficobiontes a distintos tiempos de deshidratación según la ecuación 1:

$$\text{RWC}\% = ((\text{FW} - \text{DW}) / \text{FW}) * 100$$

Ecuación 1: Cálculo del contenido relativo de agua, donde FW es el peso de los ficobiontes en estado fresco, DW es el peso de los ficobiontes

Preparación de las muestras para la espectroscopia NIRS

Los discos de celulosa con biomasa se depositaron sobre placas de Petri de vidrio volteándolos previamente para que el haz de luz incidiera directamente sobre ellos. Antes de registrar los espectros individuales de cada muestra de ficobiontes, se realizó un blanco, el cual consistía en el espectro de una de las placas de Petri con un disco de

celulosa idéntico al utilizado para manipular la biomasa. Este método se aplicó de igual manera para cada uno de los estados de los ficobiontes

Los espectros NIRS se tomaron con un espectrofotómetro con un transformada de Fourier Spectrum 100 N Series de PerkinElmer (Beaconfield, U.K.) equipado con un accesorio de reflectancia. La absorbancia fue escaneada en un rango de 1000 a 2500 nm y con 32 escaneos para cada muestra. La resolución espectral del espectrómetro fue de 0,5 nm.

Para cada muestra, se realizaron 3 réplicas técnicas.

Análisis de datos espectrales

El software Unscrambler X 10.4 se utilizó para procesar los espectros. Se aplicó la variable normal estándar (SNV) a las réplicas para corregir el efecto multiplicativo debido a la dispersión. Se realizó la media de los espectros obtenidos y se aplicó un suavizado de Savitzky-Golay. Después se realizó la corrección de la línea base. Se calculó la segunda derivada de los espectros obtenidos mediante el método de Savitzky-Golay (de polinomio 3 y 15 puntos). Los espectros de absorbancia muestran posiciones individuales de las bandas de absorción, pero se ha comprobado que aplicando la segunda derivada es posible analizar las subestructuras que pueden aparecer bajo estas bandas (Gurbanov y Unal 2018). Las asignaciones metabólicas se realizaron en función en la bibliografía existente y teniendo en cuenta los trabajos previos realizados por nuestro grupo.

Para la acuafotomica se aplicó la corrección de dispersión multiplicativa extendida (EMSC) (Martens, Harald; Stark 1991) para eliminar los efectos de la dispersión. Todos los análisis posteriores se realizaron sobre los datos espectrales transformados después de aplicar este tratamiento. Los espectros diferencia se calcularon restando el espectro promedio de los ficobiontes en estado fresco de los correspondientes espectros promediados en varios tiempos de deshidratación. Se aplicó además la segunda derivada de Savitzky-Golay (con polinomio 3 y 25 puntos) para relevar la presencia de picos escondidos o superpuestos de las especies de agua. El análisis posterior se concentró en las 6 bandas de absorbancia de agua encontradas correspondientes a las especies de agua (S_r :1346 nm, S_0 :1403 nm, S_1 :1440 nm S_2 :1464 nm, S_3 :1490 nm y S_4 :1650 nm). El análisis de componentes principales (PCA) (Wold,S; Esbensen, Kim; Geladi 1987) con validación cruzada se utilizó para la exploración de la variación espectral después de someter a los ficobiontes a procesos de deshidratación y rehidratación.

Resultados

Análisis del contenido relativo de agua (RWC)

Se ha demostrado que las mayorías de plantas superiores toleran la pérdida de cierta cantidad de agua durante periodos cortos de tiempo y pueden volver con normalidad a sus actividades fisiológicas después de la rehidratación. Estas plantas pueden sobrevivir solo con 35-40% con un contenido relativo de agua por un periodo de tiempo corto. Por debajo de este contenido, existe un punto de no retorno en el cual no recuperan sus actividades fisiológicas normales, aunque exista agua suficiente en el medio. En las microalgas de líquenes este tipo de análisis no se ha realizado y la bibliografía que analice la tolerancia a la pérdida de agua de los ficobiontes es muy escasa. En nuestras condiciones experimentales, y considerando que nuestros ficobiontes después de haber

sido recolectados directamente del cultivo tienen un RWC del 100%, comprobamos que, tras el proceso de deshidratación en atmosfera cerrada de gel de sílice, los ficobiontes estabilizan su pérdida de peso en un 16 % después de los 180 minutos (Figura 1A), manteniendo estable esta pérdida 48 horas (Figura 1B). Los ficobiontes tienen un RWC del 30% después de la rehidratación durante 24 horas y un RWC del 59% después de 48 horas.

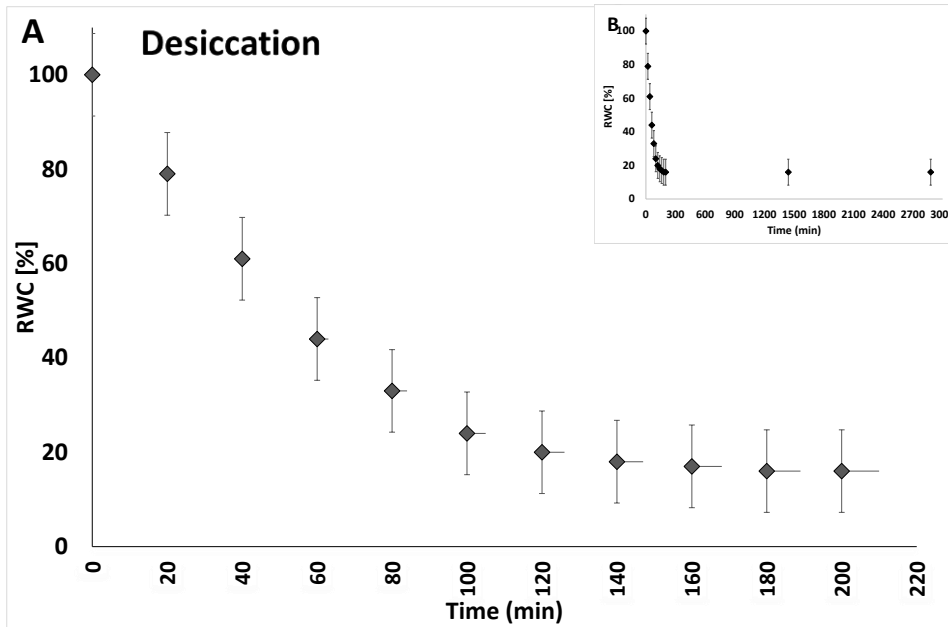


Figura 1: Dinámica del contenido relativo de agua (RWC%) durante la deshidratación en *Asterochloris erici*. Las barras de error indican el error típico de la media. A) indica los cambios en el contenido relativo de agua (%RWC) durante los 200 primeros minutos, B) indica los cambios en el contenido relativo de agua (%RWC) hasta 48 h.

Análisis de la huella metabólica de *A. erici* fresca, deshidratada y rehidratada

Después de comparar los espectros de absorbancia de las algas frescas y las algas deshidratadas durante los distintos tiempos, se analiza mediante la figura 2A, los posibles cambios metabólicos tras 24 h de deshidratación. El espectro de las algas tras 48 h de deshidratación es prácticamente igual que el 24 h, por lo que sólo se presenta éste. Esta comparación también se realiza en la figura 2B pero en este caso se ha aplicado a los espectros la segunda derivada, lo que nos permite conocer subestructuras no reveladas en el espectro de absorbancia. En este espectro de la figura 2, las bandas de absorbancias correspondientes al agua (1150, 1190, 1403, 1460, 1890 y 1930 nm) son obviamente mayores en las algas frescas. Los detalles de las bandas de absorción correspondientes al agua se muestran en la tabla 1. Las características de la absorbancia destacadas de 1190 nm, 1460 nm y 1930 nm pueden atribuirse a la combinación del primer sobretono del estiramiento del O-H y la banda de flexión del OH, el primer sobretono de la banda de estiramiento del O-H y a la combinación de la banda de estiramiento del O-H y la banda de flexión del O-H del agua, respectivamente (Kawano, S; Iyo; Iwamoto, M; Uozumi, J; Nishinari 1987; Büning-Pfaue 2003; Nielsen 2014). En las algas deshidratadas, podemos observar picos no presentes en las algas frescas. En la figura 2B se puede observar la posible asignación metabólica. En las algas deshidratadas aparecen mayor número de

picos correspondientes a lípidos insaturados (1280, 1760, 2460 nm), lípidos saturados (1575, 1730, 2300 y 2350 nm), aminas (2056 nm) y proteínas (1510 y 2170 nm).

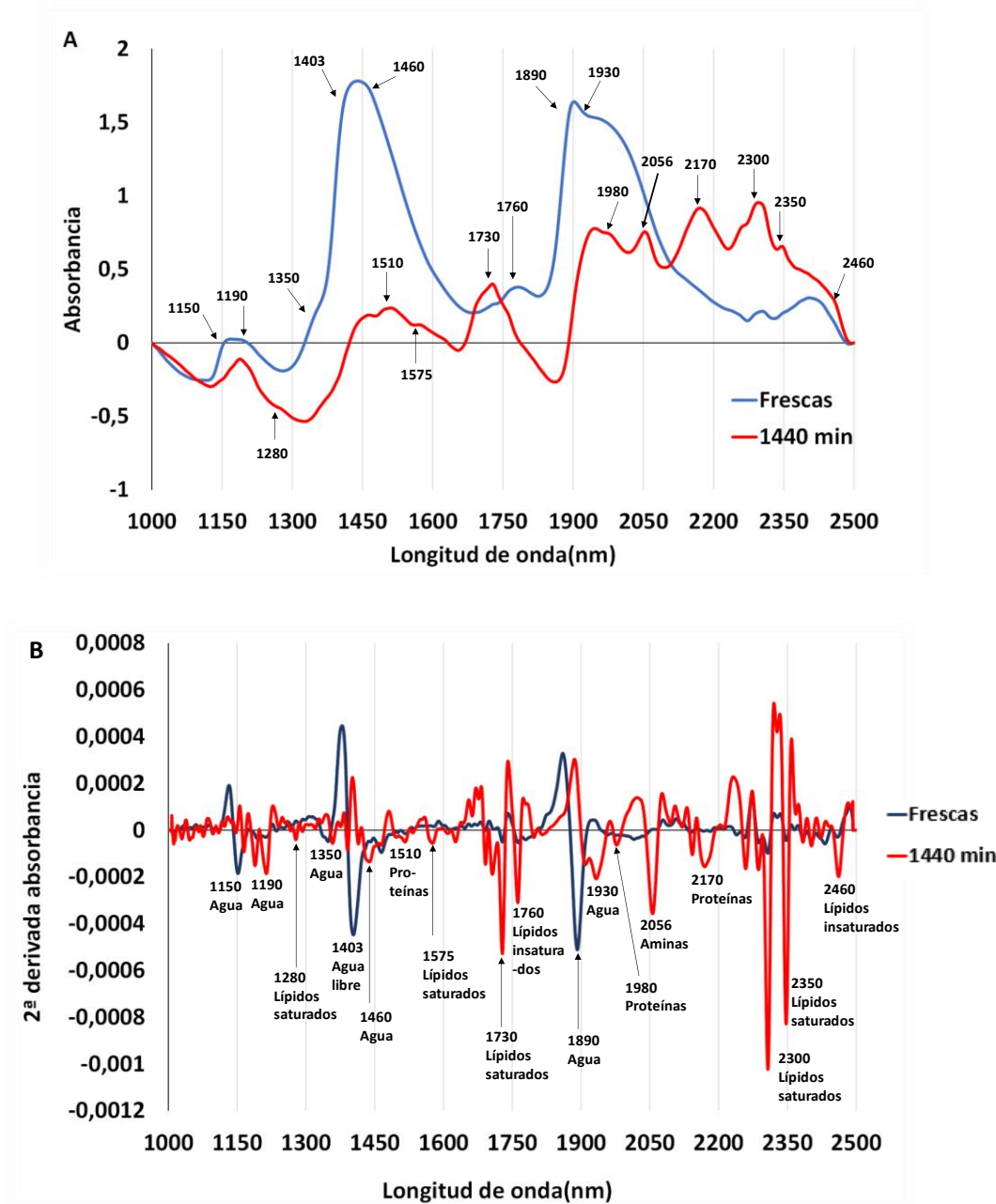


Figura 2: Espectro del ficobionte *A. erici* en estado fresco y deshidratado 24 horas. A) Espectro medio con corrección de la línea base del ficobionte *Asterochloris erici*. En la media se aplica un suavizado Savitzky-Golay. B) Espectro después de aplicar la segunda derivada de Savitzky Golay (polinomio grado 3 y 15 puntos) en ambos estados, (n=6) obtenidos por FT-NIRS. En las longitudes de ondas especificadas en el espectro se añade su posible metabolito.

Las algas se rehidrataron durante 24 y 48 horas con agua desionizada en un recipiente hermético para crear una atmosfera cerrada. Se comparo igualmente el espectro de absorbancia de las algas frescas y las algas rehidratadas durante 24 y 48 horas (Figura 3A). Como se puede observar en esta figura, es más parecido el espectro de las algas

rehidratadas 48 horas al de las algas frescas que el espectro de las algas rehidratadas 24 horas, incluso en las algas rehidratadas 24 horas aparece una banda de absorción no visible en los otros espectros. Al espectro obtenido de las algas en estos estados se aplicó igualmente la segunda derivada y se analizaron los posibles cambios metabólicos (Figura 3B). Como se puede observar en la figura, el espectro de las algas frescas coincide prácticamente con las algas rehidratadas 48 horas algo que no ocurre del todo con las algas rehidratadas durante 24 horas. En las algas rehidratadas durante 24 horas aparecen picos (en las longitudes de onda de 1930, 2056 y 2170 nm correspondientes a agua, aminos y proteínas respectivamente) que no aparecen en las algas frescas y algas rehidratadas 48 horas.

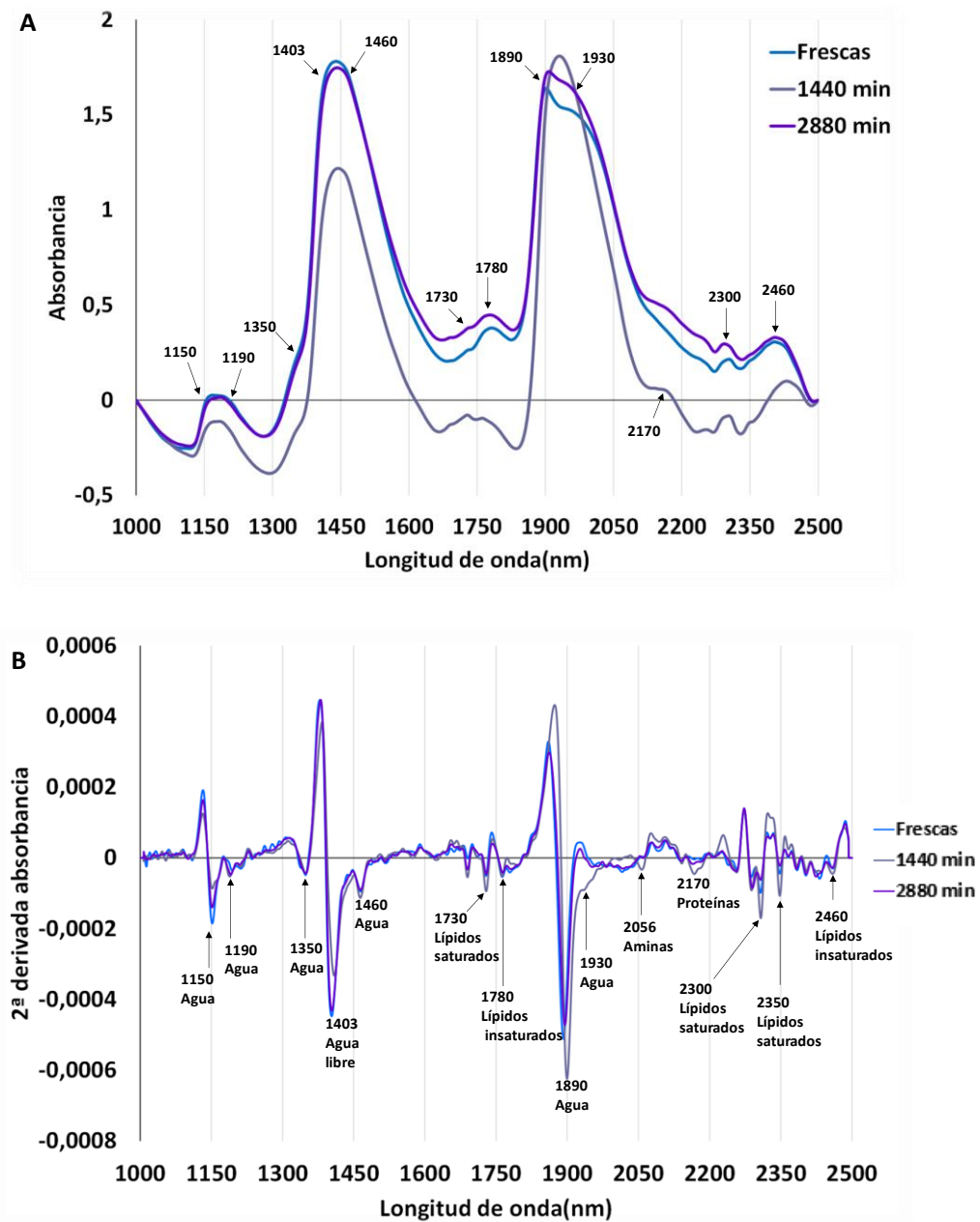


Figura 3: Espectro del ficobionte *A. erici* en estado fresco, rehidratados 24 y 48 horas. A) Espectro medio FT-NIRS con corrección de la línea base del ficobionte *Asterochloris erici* en estado fresco y tras 24 y 48 h de rehidratación (n=6). En la media

se aplica un suavizado Savitzky-Golay. B) Espectro después de aplicar la segunda derivada de Savitzky Golay (polinomio grado 3 y 15 puntos), (n=6) obtenidos por FT-NIRS. En las longitudes de ondas especificadas en el espectro se añade su posible metabolito.

Tabla 1: Asignaciones del espectro de absorción vibracional NIR del agua. v_r, v_1, v_2, v_3 indican respectivamente el modo rotacional, de estiramiento simétrico, de flexión y de estiramiento asimétrico de la molécula de agua. a, b son números enteros, ≥ 0 .

	v_r	v_1	v_2	v_3	Posición pico	Referencias
$a + b = 2$		av_1	$+ v_2$	$+ bv_3$	1190	(Kawano, S; Iyo; Luck 1974; Iwamoto, M; Uozumi, J; Nishinari 1987; Büning-Pfaue 2003; Wiley 2008; Workman, J. J; Weyer 2008; Nielsen 2014)
$a + b = 2$		av_1	$+ $	bv_3	1460	
$a + b = 1$		av_1	$+ v_2$	$+ bv_3$	1930	
$a + b = 1$	v_r	$+ av_1$	$+ $	bv_3	1350	

Espectros de substracción

Se sustrajo el espectro medio de los ficobiontes en estado fresco de los correspondientes espectros medios de los ficobiontes en los distintos tiempos de deshidratación (Figura 4), con el objetivo de analizar como responden las algas al estrés. *A. erici* mostró variaciones de absorbancia dentro del rango de 0,63 a.u. hasta el 16% de RWC. La magnitud de cambios espectrales que se pueden observar durante los distintos tiempos de deshidratación en las bandas de absorbancia asociadas al agua (1400 y 1880 nm) parecen indicar que el ficobionte se prepara para la anhidrobiosis. Casi la mitad de las bandas de absorción que se puede ver en la gráfica (marcadas con flechas) corresponden al agua y las otras bandas donde se observan cambios espectrales corresponden a lípidos saturados y proteínas.

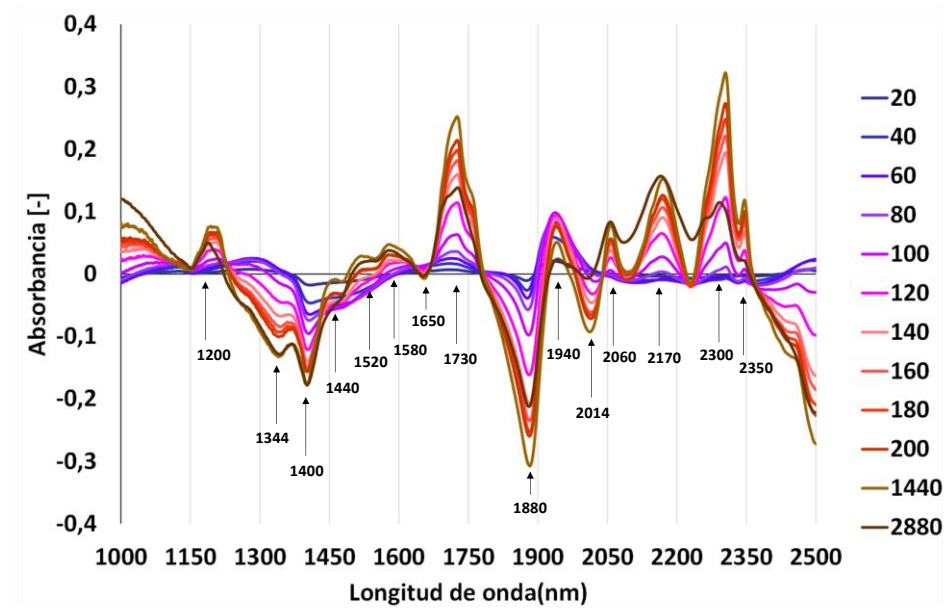


Figura 4: Espectros de diferencia de las algas frescas y las algas deshidratadas a distintos tiempos. Espectro de diferencia, después de aplicar la transformación EMSC, del ficobionte *A. erici* durante la deshidratación y en estado fresco.

Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales se utilizó para comprobar en detalle la variación espectral ocurrida durante la deshidratación y la posterior rehidratación. Como se puede observar en la figura 5, las algas liofilizadas son una variable extrema. Al agrupar las variables por grupos según el estado (frescas, deshidratadas y rehidratadas) observamos como la mayor agrupación se produce entre algas frescas, deshidratadas hasta 80 minutos y rehidratadas durante los distintos tiempos, estando estas variables fuertemente correlacionadas. Al avanzar el tiempo de deshidratación (100 minutos) disminuye la PC1. Tiempos de deshidratación de 100 y 120 minutos están cerca del centro (origen) del gráfico, lo que indica propiedades medias. En cambio, las algas deshidratadas 24 horas y las algas liofilizadas son las que están más lejos del centro. Hay otro grupo de variables agrupadas en la PC2. Comprobamos que según avanza el tiempo de deshidratación aumenta la PC2 salvo en algas deshidratadas 2880 minutos que se desmarca del resto. Ambos grupos de variables tienen correlación inversa. La distancia es mayor entre las algas liofilizadas y el grupo al que pertenece las algas frescas que la distancia hacia el grupo donde están las algas deshidratadas 24 horas.

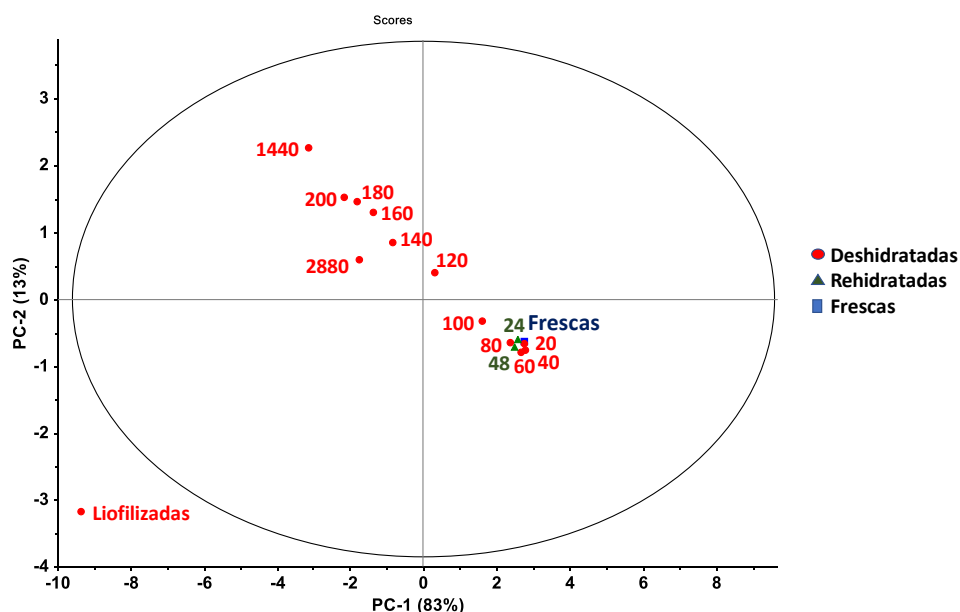


Figura 5: Gráfico de puntos del primer y segundo componente principal (PCA) aplicado a los datos de absorbancia después de un tratamiento por EMSC. PC1 y PC2 de *A. erici* en estado fresco y durante el proceso de deshidratación y posterior rehidratación. El primer componente explica el 83% de la varianza y el segundo componente explica el 13%. Se colorean los distintos estados. Se agrupan las variables por grupos y se establece un mapa que explica su relación.

Estudio de la dinámica de las moléculas de agua en los ficobiontes

La interpretación de los espectros de NIRS suele ser compleja puesto que existe mucha superposición de picos. En la banda de absorción centrada en 1450 nm, donde aparece el primer sobretono de la vibración del estiramiento del agua, se han estudiado con detalle las diferentes especies estructurales del agua. Para especificar, por tanto, la posición de los picos y solventar la superposición, se analizan los espectros de absorbancia en la región 1300-1700 nm aplicando la segunda derivada.

En la segunda derivada del espectro de *A. erici*, se observan 6 picos con variaciones en la absorbancia (marcadas con flechas en la figura 6). Se asignaron a estos picos las siguientes especies de agua: S_r (1346 nm) como agrupación de moléculas de agua protonadas, S_1 (1404 nm) como moléculas de agua libre, S_2 (1464 nm), son moléculas de agua con 2 puentes de hidrogeno, S_3 (1490 nm) como moléculas de agua con 3 puentes de hidrogeno y S_4 (1650 nm) como moléculas de agua con 4 puentes de hidrogeno (Maeda et al. 1995; Segtnan et al. 2001). La asignación de estas especies de agua basadas en estudios anteriores y en el presente estudio se muestran en la Tabla 2.

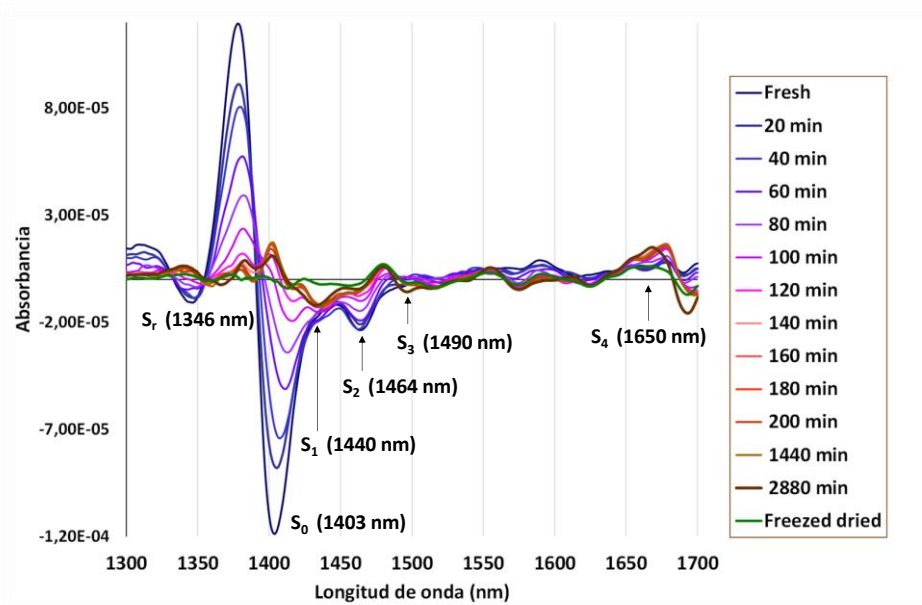


Figura 6: Segunda derivada del espectro de *Asterochloris erici* tras distintos tiempos de deshidratación y tras liofilización. Las flechas indican longitudes de onda específicas asignadas a las especies de agua: S_r (1346 nm)- clusters de agua protonada, S_0 (1403 nm)- moléculas de agua libre, S_1 (1440 nm)- moléculas de agua con un puente de hidrógeno, S_2 (1464 nm)- moléculas de agua con dos puentes de hidrógeno, S_3 (1490 nm)- moléculas de agua con tres puentes de hidrógeno y S_4 (1464 nm)- moléculas de agua con cuatro puentes de hidrógeno.

Para comparar entre los estados de agua durante la deshidratación, la absorbancia relativa de las seis especies fue calculada como la proporción de la suma de todas las absorbancias en todos los tiempos de deshidratación (Figura 7), permitiendo comparar su contribución individual en forma de peso a la estructura del agua. Proporcionalmente la que tiene mayor peso es S_0 y la que tiene menor peso es S_3 . En la primera adaptación a la deshidratación (20 minutos: ~79 % RWC) disminuyen levemente las moléculas de agua libre (S_0), aumentan ligeramente las moléculas de agua con 1 puente de hidrógeno (S_1) y las moléculas con dos puentes de hidrógeno (S_2). Las moléculas con tres puentes de hidrógeno (S_3) disminuyen levemente. La tendencia de que disminuyan progresivamente las moléculas de agua libre y aumenten las moléculas con 1 y 2 puentes de hidrógeno se repite hasta tiempos de deshidratación de 80 minutos (33 % RWC). A los 100 minutos (24 % RWC) disminuyen de manera radical las moléculas de agua libre (S_0) representando sólo un 2% de todas las especies de agua a ese tiempo. Los clústeres de moléculas de agua protonada los cuales se habían mantenido estables, también disminuyen a este tiempo. Aumentan sin embargo las demás especies de agua, sobre todo las moléculas de agua con 1 puente de hidrógeno. A tiempos posteriores (120 a 140 minutos) las moléculas de agua libre van aumentando progresivamente hasta mantenerse constantes (de 160 a 200 minutos). Al tiempo de 1440 minutos (16% RWC), las moléculas de agua libre aumentan un poco (36% del total) para volver a disminuir a los 2880 minutos (27 % del total). Las moléculas con 1 y 2 puentes de hidrógeno aumentan cuando pasan de 100 a 120 minutos para mantenerse en valores más o menos constantes en los demás tiempos de deshidratación. Las moléculas con 3 puentes de hidrógeno

alcanza valores mínimos a 40 y 60 minutos, valores más o menos constantes en los demás tiempos de deshidratación y a los 2880 minutos (16% RWC) es donde alcanza un mayor valor. Las moléculas con 4 puentes de hidrogeno alcanzan valores mayores a tiempos de 100 y 2280 minutos. En las algas que han sufrido liofilización, estas especies cambian mucho con respecto a las algas deshidratadas en atmósfera cerrada de gel de sílice, la especie que tiene menor peso es S_0 y la que tiene mayor es S_4 . Las moléculas de agua libre muestran valores menores (un 5% del total) tras la liofilización a tiempos de 1440 y 2880 minutos (27 y 36 % respectivamente). Lo mismo pasa con las moléculas con 4 puentes de hidrógeno, las algas liofilizadas muestran valores de un 35 % mientras que las algas deshidratadas durante 24 horas en una atmosfera cerrada muestran valores de un 16%. Las demás especies de agua en las algas liofilizadas no difieren mucho de las especies que encontramos en las algas deshidratadas por el otro procedimiento.

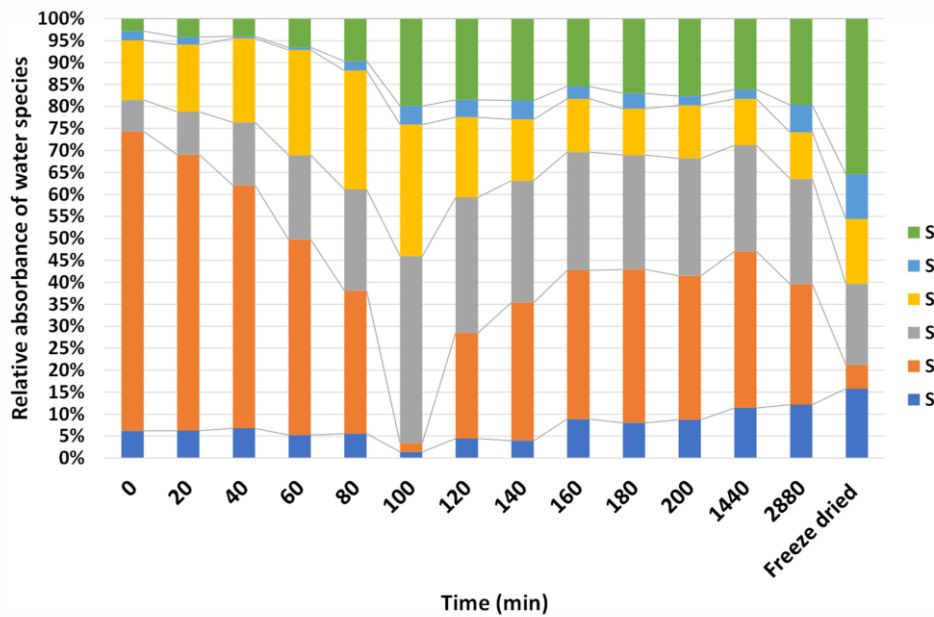


Figura 7: Dinamica de las diferentes especies de agua durante la deshidratación de *A. erici*. Absorbancia relativa de las especies de agua expresadas como tanto por ciento respecto al total.

Tabla 2: Asignación de las especies de agua en el estudio actual en base a análisis previos.

Especie de agua	S_r	S_0	S_1	S_2	S_3	S_4	Referencias
Longitud de onda (nm)	1351	1410	1439	1456	1506	1642	(Maeda et al. 1995)
	1346	1411	1441	1462	1490	1650	(Segtnan et al. 2001)
	1346	1412	1441	1462	1490	1650	(Kuroki et al. 2019)
	1346	1403	1433	1465	1497	1650	Estudio actual

Discusión

Al comparar el espectro de algas frescas y deshidratadas durante 24 horas en atmosfera cerrada de gel de sílice, comprobamos que las primeras muestran pequeños picos relacionados con lípidos insaturados, saturados, aminas y proteínas. La mayor absorbancia en las algas frescas se produce en moléculas de agua. Las interacciones entre los puentes de hidrogeno de las moléculas de agua pueden afectar al espectro NIRS.

Al analizar la perdida de agua que pueden tolerar los ficobiontes de *A. erici* en la deshidratación, comprobamos que alcanza un RWC de 16% a los 180 minutos y se mantiene estable en los tiempos posteriores (hasta 24 y 48 horas). Se comprobaron seis especies de agua en este ficobionte: S_r (1346 nm), S_0 (1403 nm), S_1 (1440 nm), S_2 (1464 nm), S_3 (1490 nm) y S_4 (1650 nm). La absorbancia relativa de estas especies en la deshidratación progresiva en atmosfera cerrada de gel de sílice es muy diferente a la que aparece en las algas congeladas y liofilizadas. En la deshidratación progresiva el mayor peso lo tiene la especie S_0 (moléculas de agua libre) y la menor la tiene S_3 (moléculas con tres puentes de hidrogeno). En cambio, en las algas liofilizadas, el mayor peso lo tiene la especie S_4 (moléculas con cuatro puentes de hidrogeno) y el menor lo tiene S_0 . En la deshidratación progresiva la tendencia clara es que disminuyan progresivamente las moléculas de agua libre y aumenten las moléculas con 1 y 2 puentes de hidrogeno (hasta los 80 minutos ~33 % RWC). A los 100 minutos (24 % RWC) esto cambia: Disminuyen de manera radical las moléculas de agua libre (sólo un 2% del total de todas las especies de agua), aumentan bastante las moléculas con 1 puente de hidrogeno. Entre los 120 y 140 minutos, las moléculas de agua libre aumentan hasta ser constantes (de 160 a 200 minutos), teniendo en cuenta que se produce una estabilización del peso a partir de los 180 minutos ~16 % RWC. En tiempo de 48 horas (16 % RWC), las moléculas de agua libre vuelven a disminuir y las moléculas con 3 puentes de hidrogeno alcanzan su mayor valor. Las moléculas con 4 puentes de hidrogeno alcanzan sus mayores valores en tiempos de 100 minutos de deshidratación y en 48 horas. En la deshidratación forzada (por la liofilización), S_0 alcanza valores menores que en la deshidratación progresiva de 24 y 48 horas. S_4 alcanza valores mayores que en las algas deshidratadas en atmosfera cerrada durante 48 horas.

Al comparar los espectros de las algas frescas, rehidratadas 24 horas y rehidratadas 48 horas, comprobamos que aparecen picos en algas rehidratadas 24 horas que no aparecen en las algas frescas y rehidratadas 48 horas, siendo estos picos correspondientes a los metabolitos de agua, aminas y proteínas. En el análisis de componentes principales comprobamos que las algas frescas están altamente correlacionadas con las algas rehidratadas (24 y 48 horas) y las algas deshidratadas hasta 80 minutos.

Los ficobiontes presentan tolerancia a la desecación (anhidrobiosis), algo que no ocurre en las algas de vida libre (Catala et al., 2010, 2013). Los ciclos de deshidratación-rehidratación les supone un estrés a los ficobiontes que podría aumentar si la rehidratación se realiza en presencia de contaminantes ambientales. Mientras estos ciclos llevan días o incluso semanas en plantas (Moore et al. 2009; Suguiyama et al. 2014) pueden llevar minutos o horas en el talo del liquen (Beckett et al. 2008) o en su

ficobionte aislado (Gasulla et al. 2009). Son organismos tolerantes a la desecación por lo que se produce menos degradación de lípidos de membrana y la desaturación de los ácidos grasos es menos pronunciada (De Paula et al. 1990; Gigon et al. 2004). Son organismos poiquilohídricos y consiguen esta alta tolerancia a la desecación mediante mecanismos constitutivos y de protección. Uno de los mecanismos que permiten a los ficobiontes tolerar la deshidratación es la acumulación de glúcidos, los cuales pueden formar puentes de hidrógeno con las regiones polares de las proteínas y los fosfolípidos de la membrana, reemplazando la función estructural del agua. También se produce la acumulación de oligogalactolípidos (lípidos con doble enlace) para preservar la membrana en este estado y se produce la acumulación de proteínas de choque térmico, involucradas en la conservación de la estructura y funciones de las macromoléculas celulares (Gasulla et al. 2021). Algo coincidente con nuestros resultados, puesto que las algas deshidratadas muestran mayor absorbancia de lípidos saturados y proteínas que las algas frescas. Rehidratar las algas con agua desionizada no les supone muchos cambios con respecto a las algas en estado fresco, salvo que en las algas rehidratadas durante 24 horas hay mayor absorción de aminos y proteínas. Además, en la rehidratación de los ficobiontes durante 24 horas no se llega ni a recobrar ni la mitad del peso que tenía en estado fresco (sólo un 30% de RWC). Se ha comprobado que en las algas rehidratadas durante 24 horas se expresan las proteínas hidrofílicas dehidrinas importantes en el estrés hídrico (Gasulla et al. 2009). En cambio, el espectro es totalmente coincidente en algas frescas y rehidratadas 48 horas.

Se ha comprobado que la estrategia que tiene cada ficobionte frente a la deshidratación se ajusta al sistema hídrico del hábitat del líquen respectivo. Por ejemplo, *Trebouxia* sp. TR9 presenta su máxima deshidratación después de 8,5 horas (17% RWC) y el ficobionte *Coccomyxa symplex* tiene su mayor deshidratación después de 7,5 horas (sólo un 8,5 % RWC). Ambas deshidrataciones se producen también en atmósfera cerrada con gel de sílice y después de 24 horas (Centeno et al. 2016). El ficobionte del presente estudio necesita sólo 3 horas para llegar al mínimo (16 % RWC). En otros estudios también se ha demostrado que *A. erici* muestra menos retención de agua puesto que en un 2% de humedad relativa, se deshidrata totalmente en 1,5 horas (Gasulla et al. 2009). Los ficobiontes presentan distintas estrategias fisiológicas para ajustarse metabólicamente a los cambios rápidos en la disponibilidad de agua que puede haber en el medio ambiente (Centeno et al. 2016).

Los cambios que observamos en las bandas correspondientes al agua según avanza la deshidratación nos indican que el agua está implicada en la adaptación a las condiciones de estrés. Indagar en el comportamiento del sistema molecular del agua en los organismos biológicos permite averiguar diferentes funcionalidades de las especies de agua y facilita la comprensión de los complejos procesos biológicos (Ball 2008; Tsenkova 2009a). En nuestro estudio se comprueba que según avanza la deshidratación las moléculas de agua libre disminuyen y aumentan el total de las especies relacionadas con los puentes de hidrógeno. El papel de las moléculas de agua libre es de apoyo en las reacciones biológicas, químicas y fisiológicas (Gowen 2012) sirviendo para contrarrestar la deshidratación. La disminución de esta especie es progresiva en nuestro estudio hasta los 100 min, sin embargo, en este tiempo, se produce un brusco descenso hasta niveles muy bajos. Esto se podría deber a que, a partir de este momento, el metabolismo entra en un

estado de anhidrobiosis. En el PCA se comprueba que este tiempo de deshidratación está separado del primer grupo de variables que corresponde a las algas frescas. A partir de los 100 minutos aumenta un poco S_0 para luego mantenerse constante y volver a disminuir en el tiempo máximo de deshidratación, disminuyendo a más de la mitad respecto al valor que tenía en estado fresco y a los pocos minutos de deshidratación. Lo mismo ocurre con el estudio realizado por Kuroki et al. (2019), donde en *H. rhodopensis* disminuyen de forma brusca las moléculas de agua libre y aumentan las moléculas con 1 y 4 puentes de hidrogeno. *A. erici* muestra a los 100 minutos de deshidratación un gran aumento de las especies con 1 y 2 puentes de hidrogeno. Es en ese tiempo de deshidratación es donde se encuentran los mayores valores de S_2 , la especie de agua más común en el agua que rodea a las proteínas (Lee and Kim 2009), lo que confirma la importancia de la interacción agua-proteína para la vida de las plantas (Kuroki et al. 2019). En los espectros de diferencia, se puede observar cómo a partir de los 100 minutos de deshidratación aparecen bandas relacionadas con lípidos saturados y proteínas. Las moléculas con 3 puentes de hidrogeno alcanzan su mayor valor en algas deshidratadas 48 horas. Las moléculas con 4 puentes de hidrogeno alcanzan valores más altos en deshidrataciones de 100 minutos y 48 horas. Organizar el agua en puentes de hidrogeno es consistente con mecanismos de adaptación a la deshidratación como son la contracción del volumen, la acumulación de azúcares (Müller et al. 1997; Georgieva et al. 2017), la subdivisión de vacuolas (Georgieva et al. 2017) y el plegamiento de la pared celular (Cooper and Farrant 2002; Farrant et al. 2015).

Al comparar las especies de las algas deshidratadas 48 horas con las algas liofilizadas, se comprueba que la deshidratación ha sido forzada puesto que las moléculas de agua libre están muy bajas y en términos generales aumentan los valores de todas las especies de agua salvo S_1 que disminuye un poco. Sobre todo, en algas liofilizadas aumenta en una gran proporción las moléculas con 4 puentes de hidrogeno. Al haber tanta diferencia entre los dos tipos de deshidratación, comprobamos que los ficobiontes tienen mecanismos de adaptación a la deshidratación y que estos se interrumpen si forzamos a una deshidratación más rápida. Se comprobó que en procesos de deshidratación muy rápidos (menos de 1 hora) se producen grandes daños en la membrana, mientras que, en proceso de deshidratación más lento, se expresan y se acumulan factores que pueden contribuir a la estabilidad de la membrana. Además, la síntesis "de novo" o la activación de los factores de resistencia a la desecación tiene lugar durante el proceso de deshidratación, en la tolerancia a la desecación no sólo los mecanismos constitutivos están implicados. Se ha demostrado que *Asterochloris erici* muestra cierta capacidad de transporte de electrones y mayores niveles de fotoprotección al final de deshidrataciones lentas en comparación con las algas deshidratadas de manera más rápida (Gasulla et al. 2009).

Se ha comprobado mediante el presente estudio que someter a los ficobiontes a procesos de deshidratación/rehidratación le supone un estrés, puesto que hemos comprobado cambios metabólicos. Además, con la ayuda de la acuafotónica, se ha comprobado que los ficobiontes tienen una adaptación rápida a la anhidrobiosis, disminuyen las moléculas de agua libre y aumentan las especies con puentes de hidrogeno, incluso antes de que se llegue a la deshidratación total. Se han realizado estudios de las funcionalidades del agua en plantas tolerantes a la deshidratación, pero no existen estos análisis con microalgas. Sería interesante profundizar en como estas especies de agua influyen en la composición metabólica del ficobionte cuando esta deshidratado y cuando esta rehidratado con

otros tratamientos, como pueden ser contaminantes ambientales. En trabajos futuros, sería importante rehidratar con otros tratamientos y comparar con los resultados del presente estudio, así como comparar entre diferentes especies de ficobiontes.

Conclusiones

Se ha demostrado que mediante la novedosa técnica -NIRS se puede obtener una “huella dactilar” de los ficobiontes que permita asociar cambios metabolómicos con situaciones de estrés, como son los ciclos continuos de deshidratación/rehidratación. El uso de la acuafotónica permite comprobar que el estudio de las moléculas de agua nos facilita comprender los mecanismos de tolerancia a la deshidratación. Se comprueba que antes de que llegue al punto de la mayor deshidratación (24-48 horas) se ha producido una estabilización del peso, llegando a un RWC del 16% a los 180 minutos. Se comprobaron seis especies de agua en este ficobionte: Sr (1346 nm), S0 (1403 nm), S1 (1440 nm), S2 (1464 nm), S3 (1490 nm) y S4 (1650 nm). Según avanza la deshidratación, disminuyen las moléculas de agua libre y aumentan las moléculas con puentes de hidrogeno, importantes para mantener la viabilidad de las células situaciones de estrés. El descenso brusco de las moléculas de agua libre a los 100 minutos y el aumento de las moléculas con 1 puente de hidrogeno parecen indicar que están preparando al ficobionte para la anhidrobiosis. En los espectros de las algas deshidratadas después de 24 horas se ha confirmado mayor absorbancia de lípidos saturados y proteínas que las algas frescas, metabolitos importantes para mantener las moléculas y la membrana durante la deshidratación. Por otro lado, las algas rehidratadas durante 24 horas con agua desionizada no mostraban muchas diferencias con respecto a las algas frescas, pero había mayor absorción de aminos y proteínas. Estos metabolitos podrían expresarse debido al estrés que supone la rehidratación puesto que la expresión de determinadas proteínas es importante para hacer frente al estrés hídrico. La rehidratación durante 48 horas no supuso ningún cambio respecto a las algas frescas. Rehidratar con otros tratamientos como contaminantes ambientales puede ser importante a la hora de comparar resultados y para averiguar la importancia de la dinámica de la estructura del agua en estas situaciones de estrés.

Contribuciones de los autores

El estudio fue diseñado por MC. Los experimentos fueron realizados por MRH. Ambos autores escribieron y revisaron los textos.

Agradecimientos

Este proyecto ha sido financiado por MINECO y FEDER (CGL2016-79158-P), PROMETEO/2017/039 y CULTIVE. Un agradecimiento especial a Enrique Pérez Martínez por su ayuda en el análisis estadístico.

Referencias

- Ball P (2008) Water as an active constituent in cell biology. *Chem Rev* 108:74–108. doi: 10.1021/cr068037a
- Beckett RP, Kranner I, Minibayeva F V (2008) Stress physiology and the symbiosis. In: *Lichen Biology, Second Edition*.

- Büning-Pfaue H (2003) Analysis of water in food by near infrared spectroscopy. *Food Chem* 82:107–115. doi: 10.1016/S0308-8146(02)00583-6
- Casale M, Bagnasco L, Giordani P, et al (2015) NIR spectroscopy as a tool for discriminating between lichens exposed to air pollution. *Chemosphere* 134:355–360. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.03.095
- Centeno DC, Hell AF, Braga MR, et al (2016) Contrasting strategies used by lichen microalgae to cope with desiccation-rehydration stress revealed by metabolite profiling and cell wall analysis. *Environ Microbiol* 18:1546–1560. doi: 10.1111/1462-2920.13249
- Cooper K, Farrant JM (2002) Recovery of the resurrection plant *Craterostigma wilmsii* from desiccation: Protection versus repair. *J Exp Bot* 53:1805–1813. doi: 10.1093/jxb/erf028
- Cui X, Liu X, Yu X, et al (2017) Water can be a probe for sensing glucose in aqueous solutions by temperature dependent near infrared spectra. *Anal Chim Acta* 957:47–54. doi: 10.1016/j.aca.2017.01.004
- De Paula FM, Thi ATP, De Silva JV, et al (1990) Effects of water stress on the molecular species composition of polar lipids from *Vigna unguiculata* L. leaves. *Plant Sci* 66:185–193. doi: 10.1016/0168-9452(90)90203-Z
- Domínguez-Morueco N, Moreno H, Barreno E, Catalá M (2014) Preliminary assessment of terrestrial microalgae isolated from lichens as testing species for environmental monitoring: lichen phycobionts present high sensitivity to environmental micropollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 99:35–44. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.10.007
- Ellis JW, Bath J (1938) Modifications in the near infra-red absorption spectra of protein and of light and heavy water molecules when water is bound to gelatin. *J Chem Phys* 6:723–729. doi: 10.1063/1.1750157
- Farrant JM, Cooper K, Hilgart A, et al (2015) A molecular physiological review of vegetative desiccation tolerance in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker). *Planta* 242:407–426. doi: 10.1007/s00425-015-2320-6
- Gäb M, Hoffmann K, Lobe M, et al (2006) NIR-spectroscopic investigation of foliage of ozone-stressed *Fagus sylvatica* trees. *J For Res* 11:69–75. doi: 10.1007/s10310-005-0186-3
- Garty J, Kloog N, Cohen Y, et al (1997) The effect of air pollution on the integrity of chlorophyll, spectral reflectance response, and on concentrations of nickel, vanadium, and sulfur in the lichen *Ramalina duriaei* (De Not.) Bagl. *Environ Res* 74:174–187. doi: 10.1006/enrs.1997.3727
- Gasulla F, De Nova PG, Esteban-Carrasco A, et al (2009) Dehydration rate and time of desiccation affect recovery of the lichenic algae *Trebouxia erici*: Alternative and classical protective mechanisms. *Planta* 231:195–208. doi: 10.1007/s00425-009-1019-y
- Gasulla F, Del Campo EM, Casano LM, Guéra A (2021) Advances in understanding of desiccation tolerance of lichens and lichen-forming algae. *Plants*. doi: 10.3390/plants10040807

- Georgieva K, Rapparini F, Bertazza G, et al (2017) Alterations in the sugar metabolism and in the vacuolar system of mesophyll cells contribute to the desiccation tolerance of *Haberlea rhodopensis* ecotypes. *Protoplasma* 254:193–201. doi: 10.1007/s00709-015-0932-0
- Gigon A, Matos AR, Laffray D, et al (2004) Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (Ecotype Columbia). *Ann Bot* 94:345–351. doi: 10.1093/aob/mch150
- Gowen AA (2012) Water and Food Quality. *Contemp Mater* 1:31–37.
- Gowen AA, Marini F, Tsuchisaka Y, et al (2015) On the feasibility of near infrared spectroscopy to detect contaminants in water using single salt solutions as model systems. *Talanta* 131:609–618. doi: 10.1016/j.talanta.2014.08.049
- Grant A, Davies AMC, Bilverstone T (1989) Simultaneous determination of sodium hydroxide, sodium carbonate and sodium chloride concentrations in aqueous solutions by near-infrared spectrometry. *Analyst* 114:819–822. doi: 10.1039/AN9891400819
- Hayes KR, Douglas WS, Terrell Y, et al (1993) Predictive ability of the *Daphnia magna* IQ toxicity Test™ for ten diverse water treatment additives. *Bull Environ Contam Toxicol*. doi: 10.1007/BF00198289
- Iwamoto, M; Uozumi, J; Nishinari K (1987) Preliminary investigation of the state of water in foods by near infrared spectroscopy. In: eds. Hello, J. Kaffka, K. & Gonczy J (ed) *Proceedings of International Near Infrared Spectroscopy / Near Infrared Technology Conference*. Akademiai Kiado, pp 3–12
- Jinendra B (2011) *Near Infrared Spectroscopy and Aquaphotomics: Novel Tool for Biotic and Abiotic Stress Diagnosis of Soybean*. Kobe University
- Jinendra B, Tamaki K, Kuroki S, et al (2010) Near infrared spectroscopy and aquaphotomics: Novel approach for rapid in vivo diagnosis of virus infected soybean. *Biochem Biophys Res Commun* 397:685–690. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.007
- Kawano, S; Iyo C *Useful and Advanced Information in the Field of Near Infrared Spectroscopy*, Tsuchikawa.
- Kovacs Z, Bázár G, Oshima M, et al (2015) Water spectral pattern as holistic marker for water quality monitoring. *Talanta* 147:598–608. doi: 10.1016/j.talanta.2015.10.024
- Kuroki S, Tsenkova R, Moyankova D, et al (2019) Water molecular structure underpins extreme desiccation tolerance of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Sci Rep* 9:1–12. doi: 10.1038/s41598-019-39443-4
- Larrechi MS, Callao MP (2003) Strategy for introducing NIR spectroscopy and multivariate calibration techniques in industry. *TrAC Trends Anal Chem* 22:634–640. doi: 10.1016/S0165-9936(03)01005-7
- Lee J, Kim SH (2009) Water polygons in high-resolution protein crystal structures. *Protein Sci* 18:1370–1376. doi: 10.1002/pro.162
- Luck WA (1974) *Structure of Water and Aqueous Solutions*. In: Luck WAP (ed) *Proceedings of the International Symposium Marburg*. Verlag Chemie, pp 248–284

- Maeda H, Ozaki Y, Tanaka M, et al (1995) Near Infrared Spectroscopy and Chemometrics Studies of Temperature-Dependent Spectral Variations of Water: Relationship between Spectral Changes and Hydrogen Bonds. *J Near Infrared Spectrosc* 3:191–201. doi: 10.1255/jnirs.69
- Martens, Harald; Stark E (1991) Extended multiplicative signal correction and spectral interference subtraction: new preprocessing methods for near infrared spectroscopy*. *J Pharm Biomed Anal* 9:625–635. doi: 10.1002/bate.200810020
- Mathias Weber J, Kelley JA, Robertson WH, Johnson MA (2001) Hydration of a structured excess charge distribution: Infrared spectroscopy of the O²⁻(H₂O)_n, (1 ≤ n ≤ 5) clusters. *J Chem Phys* 114:2698–2706. doi: 10.1063/1.1338529
- Moore JP, Le NT, Brandt WF, et al (2009) Towards a systems-based understanding of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci* 14:110–117. doi: 10.1016/j.tplants.2008.11.007
- Müller J, Sprenger N, Bortlik K, et al (1997) Desiccation increases sucrose levels in *Ramonda* and *Haberlea*, two genera of resurrection plants in the Gesneriaceae. *Physiol Plant* 100:153–158. doi: 10.1034/j.1399-3054.1997.1000117.x
- Muncan J, Tsenkova R (2019) Aquaphotomics-From Innovative Knowledge to Integrative Platform in Science and Technology. *Molecules*. doi: 10.3390/MOLECULES24152742/MOLECULES_24_02742_PDF.PDF
- P. Williams KN (1987) *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. USA
- Roggo Y, Duponchel L, Huvenne J-P (2007) Quality Evaluation of Sugar Beet (*Beta vulgaris*) by Near-Infrared Spectroscopy. *J Agric Food Chem* 52:1055–1061. doi: 10.1021/jf0347214
- Segtnan VH, Šašić Š, Isaksson T, Ozaki Y (2001) Studies on the structure of water using two-dimensional near-infrared correlation spectroscopy and principal component analysis. *Anal Chem* 73:3153–3161. doi: 10.1021/ac010102n
- Smith JD, Cappa CD, Wilson KR, et al (2005) Unified description of temperature-dependent hydrogen-bond rearrangements in liquid water. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14171–14174. doi: 10.1073/pnas.0506899102
- Suguiyama VF, Silva EA, Meirelles ST, et al (2014) Leaf metabolite profile of the Brazilian resurrection plant *Barbacenia purpurea* Hook. (Velloziaceae) shows two time-dependent responses during desiccation and recovering. *Front Plant Sci* 5:1–14. doi: 10.3389/fpls.2014.00096
- Traba HM, Domínguez-Morueco N, Barreno E, Catalá M (2017) Lichen microalgae are sensitive to environmental concentrations of atrazine. *J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes* 52:223–228. doi: 10.1080/03601234.2016.1270679
- Tsenkova R (2009a) Introduction aquaphotomics: Dynamic spectroscopy of aqueous and biological systems describes peculiarities of water. *J Near Infrared Spectrosc* 17:303–314. doi: 10.1255/jnirs.869
- Tsenkova R Aquaphotomics : VIS-Near Infrared Spectrum of Water as Biological Marker Roumiana Tsenkova. In: Conference on the Physics, Chemistry and Biology of

Water. Sofia,

- Tsenkova R Aquaphotomics: the extended water mirror effect explains why small concentrations of protein in solution can be measured with near infrared light. NIR news 9:12–13.
- Tsenkova R (2007) AquaPhotomics: Water Absorbance Pattern as a Biological Marker for Disease Diagnosis and Disease Understanding. NIR news 18:14–16. doi: 10.1255/nirn.1014
- Tsenkova R (2008) Aquaphotomics: The Extended Water Mirror Effect Explains Why Small Concentrations of Protein in Solution Can Be Measured with near Infrared Light. NIR news 19:13–14. doi: 10.1255/nirn.1079
- Tsenkova R (2009b) Aquaphotomics: Dynamic Spectroscopy of Aqueous and Biological Systems Describes Peculiarities of Water. J Near Infrared Spectrosc 17:303–313.
- Tsenkova R, Kovacs Z, Kubota Y (2015) Aquaphotomics: Near infrared spectroscopy and water states in biological systems. Subcell Biochem 71:189–211. doi: 10.1007/978-3-319-19060-0_8
- Wold,S; Esbensen, Kim; Geladi P (1987) Principal component analysis. Chemom Intell Lab Syst 2:37–52. doi: 10.1007/978-0-387-87811-9_2

Discusión General

En el siglo XXI, la ecotoxicología tiene que avanzar en el desarrollo de herramientas que evalúen el riesgo que suponen los contaminantes emergentes y alejarse de los enfoques toxicológicos tradicionales que utilizan la mayoría de las agencias reguladoras. La liberación de contaminantes emergentes al medio ambiente seguramente ha ocurrido durante mucho tiempo, pero se necesita el desarrollo de nuevos métodos de detección para admitirlo. La síntesis de sustancias químicas o los cambios en su uso, así como la eliminación de los productos existentes, pueden crear nuevas fuentes de contaminantes. En la actualidad, los contaminantes emergentes no están incluidos en los programas rutinarios de seguimiento (inter)nacionales y su comportamiento, destinos y efectos ecotoxicológicos no se conocen bien. Los métodos de muestreo y análisis no están coordinados, centrándose en determinados contaminantes. Los límites de detección para ciertos contaminantes peligrosos son demasiados altos para una evaluación del riesgo adecuada (Connon et al. 2012).

Los análisis químicos identifican y cuantifican las concentraciones de los contaminantes, pero tienen una serie de limitaciones. Proporcionan poca información sobre las interacciones de los compuestos en mezclas complejas o sobre los posibles impactos en especies no objetivo y no contemplando la biodisponibilidad. Por otro lado, no tienen en cuenta la variabilidad espacio-temporal y existen dificultades en establecer los límites de detección analítica. Para obtener una evaluación correcta de los riesgos y amenazas, es necesario que los análisis químicos sean complementados con métodos biológicos. Se ha propuesto desde finales del siglo pasado utilizar organismos vivos para obtener información sobre la calidad de los medios y para analizar la biodisponibilidad de los contaminantes (McFeters et al. 1983; Kwan and Dutka 1990; Codina et al. 1993; Zhou et al. 2008; Waykar and Deshmukh 2012).

Las especies centinela reflejan los cambios fisiológicos o el impacto biológico de los contaminantes en la biota (Timbrell 1998). En los últimos 30 años, se ha desarrollado ampliamente la medición de biomarcadores en las especies centinela ya que son herramientas sensibles que reflejan efectos subletales en los organismos y tienen capacidad pronóstica, indicando un efecto medible antes de que el rendimiento del organismo, población o comunidad se vea afectado (Amiard, J.C.; Amiard-Triquet 2008; Amiard-Triquet 2009). Mediante la evaluación del uso del biomarcador de campo de peroxidación lipídica (capítulo 1) se demostró que se puede hacer un seguimiento de los microcontaminantes en los sedimentos y en la biota, algo que con otras herramientas no se consigue, teniendo en cuenta también sus posibles efectos sinérgicos, antagónicos y aditivos (Luo et al. 2014a). Se comprobó que existe contaminación agraria difusa y que las especies centinela pueden estar expuestas de manera continua a este tipo de sustancias, aunque sea a bajas concentraciones, lo cual conlleva la bioacumulación y supone un detrimento en su estado de salud (Madigosky et al. 1991). Además, estas sustancias podrían sufrir procesos de biomagnificación en las cadenas alimenticias (Arnot and Gobas 2006). La medición de biomarcadores en especies centinela (biomarcadores de campo) tienen una mayor trascendencia desde el punto de vista ecológico que los ensayos de laboratorio (Crane and Babut 2007) puesto que los bioensayos no permiten extrapolar directamente los resultados al entorno natural ya que existen factores abióticos y bióticos que interfieren en la respuesta de los organismos (Kimball and Levin 1985b; George-Ares

and Clark 2000b). Este tipo de herramientas facilita la evaluación de la toxicidad en el campo, puesto que integran los efectos combinados de las condiciones ambientales y la exposición variable a las sustancias químicas tóxicas (Werner et al. 2010). Sin embargo, existen factores físicos específicos del lugar que pueden influir en este tipo de mediciones (Burton et al. 2005), por ello, para utilizar este tipo de herramientas se requiere de una elaborada planificación y de importantes recursos (desplazamiento, captura y análisis) lo que provoca que aumenten los costes y el personal necesario para su medición.

En el capítulo 2 por el contrario se presenta un microbioensayo más rápido y barato. Además, se utilizan microalgas de líquenes representativas de ecosistemas terrestres con alta relevancia ecológica y biológica (Catala et al. 2009; Feito et al. 2012b; Domínguez-Morueco et al. 2014). En la evaluación de la contaminación ambiental se necesita el desarrollo de microbioensayos representativos de ecosistemas terrestres puesto que la mayoría de las evaluaciones se realiza con organismos acuáticos (Catala et al. 2009). Los organismos terrestres pueden estar expuestos a microcontaminantes debido a los aerosoles que se generan por la irrigación de los campos agrícolas con aguas superficiales o al vertido en los suelos de los lodos de las depuradoras y su posterior laboreo (Vazquez-Roig et al. 2011; Martín Ruel et al. 2012; Domínguez-Morueco et al. 2014). Existen otros trabajos preliminares donde también se han utilizado organismos terrestres, como son los realizados con esporas y gametofitos de helechos (Catala 2009, Feito 2012). Sin embargo, estos organismos no se encuentran entre la flora más relevante del clima mediterráneo, habiendo mayor abundancia de líquenes. Los ficobiontes de líquenes son miembros de las costras biológicas y son organismos simbióticos mostrando tolerancia al estrés biótico y abiótico (incluidos tóxicos). Una de las principales ventajas de las microalgas de líquenes es su pequeño tamaño, lo que permite reducir los costes respecto a las pruebas de toxicidad masiva (Walker et al. 1998; Wadhia and Thompson 2007b). Además, como estas especies son representativas del ecosistema estudiado, aumenta la fiabilidad de la interpretación y extrapolación de los resultados de laboratorio (Chung et al. 2007). En la de detección y seguimiento de la toxicidad se demuestra mediante el desarrollo del microbioensayo del capítulo 2 que se puede evolucionar hacia el diseño de prometedoras herramientas coste-eficientes, las cuales combinen la relevancia biológica y ecológica junto con la alta sensibilidad y sencillez (Feito et al. 2012b). En este capítulo, se aplicó un método que permitió obtener datos masivos y rápidos de toxicidad, siendo un enfoque innovador puesto que no existe bibliografía donde se aborde la toxicidad al rehidratar organismos adaptados a la anhidrobiosis, una etapa clave de su biología. En este capítulo se demuestra que contaminantes ambientales de diversa naturaleza (metales pesados, productos farmacéuticos y asociados a actividades industriales) inducen distinta respuesta celular dependiendo del biomarcador elegido. Además, en la mayoría de los tratamientos de rehidratación, este microbioensayo es capaz de detectar contaminantes por debajo del rango de concentraciones ambientales. Se utilizan organismos aéreo-terrestres como son los ficobiontes de líquenes, los cuales también pueden ser utilizados para detectar contaminantes en aguas superficiales. Además, gracias a este microbioensayo, se puede desarrollar un kit de fácil uso para evaluar la toxicidad de una muestra *in situ*. Esta muestra puede ser de aguas ambientales, lixiviados del suelo e incluso las extracciones de muestras de aire en agua. Sin embargo, no sabemos la sensibilidad de este microbioensayo ante mezclas complejas, productos secundarios o metabolitos, frecuentes en el medio ambiente. Otra limitación es que no se conoce en

profundidad la biología y fisiología de las distintas especies de ficobiontes, lo que es importante a la hora de desarrollar distintos microbioensayos. La biología de los ficobiontes es muy desconocida, se conoce muy poco acerca de su sensibilidad ante los agentes tóxicos o si su respuesta es similar a las microalgas acuáticas o plantas vasculares (Catala et al. 2013; Álvarez et al. 2015a).

Las células de estos y otros organismos están afectadas por factores intrínsecos y extrínsecos, afectando a la significancia y la relevancia de los datos (Corte et al. 2010). La espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier se ha utilizado como técnica analítica de identificación de los grupos funcionales de los compuestos, permitiendo estudiar las específicas interacciones entre las moléculas biológicas en los talos líquénicos (Meisurova et al. 2009; Liao et al. 2010; Freitag et al. 2011). Se puede monitorizar los cambios en la estructura y las propiedades de biomoléculas celulares como los ácidos nucleicos, las proteínas, los carbohidratos y los lípidos (Gurbanov et al. 2018). Esta técnica permite caracterizar el perfil biomolecular del líquen *Cladonia convoluta* después de haber sido expuesto a plomo, resaltando el potencial de los líquenes en la descontaminación (Gurbanov and Unal 2018). Gracias a la técnica NIRS, se pueden obtener espectros únicos de líquenes que permiten distinguir muestras de zonas contaminadas y de no contaminadas (Casale et al. 2015). Los espectros obtenidos por medio de esta técnica contienen mucha información y permite detectar los primeros daños fisiológicos y alteraciones debidas al estrés ambiental (Gäb et al. 2006). El análisis del estado metabólico de las células nos permite comprobar que un organismo ha sido sometido a una situación de estrés como puede ser la exposición a un toxico ambiental. Mediante la aplicación de la FT-NIRS y la aquafotómica, en el capítulo 3 hemos podido indagar en los mecanismos de tolerancia a la deshidratación que tienen los ficobiontes, puesto que los cambios en la estructura del agua reflejan los cambios en los metabolitos principales y antioxidantes (Kuroki et al. 2019). Los patrones espectrales del agua se pueden utilizar como biomarcador del estrés abiótico y biótico en plantas (Jinendra et al. 2010). Mediante estos estudios se pueden comparar los mecanismos de tolerancia a la deshidratación de las microalgas líquénicas con respecto a otros organismos tolerantes a la desecación y por tanto comprobar las distintas respuestas frente al estrés en los ciclos de deshidratación/ rehidratación. Estos ciclos solo llevan horas o minutos en los ficobiontes de los líquenes (Gasulla et al. 2009). Mediante este capítulo se comprobó que existen alteraciones metabólicas en los ficobiontes después de someterlos a estrés (deshidratación/rehidratación). Las algas deshidratadas 24 horas mostraban mayor absorbancia de lípidos saturados y proteínas que las algas frescas (importantes en la preservación de la membrana y para conservar estructuras y funciones de las macromoléculas frente a la deshidratación). Las algas rehidratadas 24 horas mostraban mayor absorbancia de aminos y proteínas (hacen frente al estrés hídrico) y eso que sólo se habían recuperado un 30% de su contenido relativo de agua (RWC). La rehidratación durante 48 horas no le supuso ningún cambio (59% RWC). Por último, el estudio de la dinámica de agua nos permitió comparar entre los estados de agua durante el proceso de la deshidratación. Mediante este estudio se demostró que el agua está implicada en la adaptación a las condiciones de estrés. Se comprueba que ni siquiera hace falta llegar a 180 minutos (donde se estabiliza el peso ~16% RWC) para comprobar que el metabolismo está entrando en un proceso de anhidrobiosis (ocurre a los 100 min ~24% RWC). Según avanza la deshidratación disminuyen la especie de agua que contrarresta la

deshidratación (S_0) y aumentan las especies con puentes de hidrogeno, como mecanismos de adaptación a la deshidratación. A los 100 minutos de deshidratación, la especie S_0 (moléculas de agua libre) disminuye de manera radical (sólo un 2% del total de todas las especies de agua). En ese tiempo, aumentan las especies con 1 y 2 enlaces de hidrogeno. El espectro de diferencia también confirma estos resultados, puesto que a partir de ese tiempo aparecen bandas relacionadas con lípidos saturados y proteínas. Nuestros resultados son consistentes con otros estudios donde se analizan la tolerancia a la deshidratación en especies de plantas, donde disminuyen las moléculas de agua libre y aumentan las moléculas con 1 y 4 puentes de hidrogeno(Kuroki et al. 2019). Mediante nuestros hallazgos se comprueba como la especie de ficobionte del presente capítulo tiene una adaptación rápida a la anhidrobiosis, puesto que disminuyen las moléculas de agua libre y aumentan las especies con puentes de hidrogeno, incluso antes de que llegue a la deshidratación total y nos permite profundizar un poco más en su biología. Mediante este capítulo se ha demostrado que el analisis de la estructura del agua mediante la técnica FT-NIRS nos permite conocer los mecanismos de tolerancia a la deshidratación en una especie con gran relevancia ecológica como son los ficobiontes y como este enfoque innovador puede tener aplicaciones ambientales. Utilizar esta técnica, permitiría desarrollar un microbioensayo novedoso donde se podría asociar la huella metabólica con situaciones de estrés, como puede ser la rehidratación con distintos contaminantes ambientales. Si en estos microbioensayos se utiliza además especies como son los ficobiontes de líquenes aumenta la sensibilidad, son más coste-eficientes y presentan mayor relevancia ecológica.

Nuestros hallazgos científicos permiten contribuir al desarrollo de nuevas herramientas de pronóstico ambiental más novedosas, coste-eficientes, sensibles y rápidas y con una mayor relevancia ecológica y biológica que las utilizadas actualmente(Marugán et al. 2012).

Referencias

- Adams SM (1990) Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish.
- Altenburger R, Ait-Aissa S, Antczak P, et al (2015) Future water quality monitoring - Adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management. *Sci Total Environ* 512–513:540–551. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.12.057
- Álvarez R, del Hoyo A, Díaz-Rodríguez C, et al (2015) Lichen Rehydration in Heavy Metal-Polluted Environments: Pb Modulates the Oxidative Response of Both *Ramalina farinacea* Thalli and Its Isolated Microalgae. *Microb Ecol* 69:698–709. doi: 10.1007/s00248-014-0524-0
- Amiard-Triquet C (2009) *Environmental Assessment of Estuarine Ecosystems: A Case Study*. CRC Press, Boca Raton
- Amiard, J.C.; Amiard-Triquet C. (2008) Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. In: Lavoisier Tec & Doc P (ed).
- Amiard, JC; Amiard-Triquet CMC (2015) *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Elsevier, Oxford
- Arnot JA, Gobas FAPC (2006) A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environ Rev* 14:257–297. doi: 10.1139/A06-005
- Backhaus T, Karlsson M (2014) Screening level mixture risk assessment of pharmaceuticals in STP effluents. *Water Res* 49:157–165. doi: 10.1016/j.watres.2013.11.005
- Barcelo D, Petrovic M (2008) *Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste. Occurrence, Analysis and Effects*, Springer. Berlin, Germany
- Berhet B (2013) *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects*, CRC Press,.
- Blaise C (1991) Microbiotests in aquatic ecotoxicology: Characteristics, utility, and prospects. *Environ Toxicol Water Qual* 6:145–155. doi: 10.1002/tox.2530060204
- Bucheli TD, Fent K (1995) Induction of Cytochrome P450 as a Biomarker for Environmental Contamination in Aquatic Ecosystems. *Crit Rev Environ Sci Technol* 25:201–268. doi: 10.1080/10643389509388479
- Burton GA, Greenberg MS, Rowland CD, et al (2005) In situ exposures using caged organisms: A multi-compartment approach to detect aquatic toxicity and bioaccumulation. *Environ Pollut* 134:133–144. doi: 10.1016/j.envpol.2004.07.008
- Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, et al (2000) The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ* 247:295–311. doi: 10.1016/S0048-9697(99)00499-4
- Casale M, Bagnasco L, Giordani P, et al (2015) NIR spectroscopy as a tool for discriminating between lichens exposed to air pollution. *Chemosphere* 134:355–360. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.03.095
- Catala M, Esteban M, Rodríguez-Gil J-L, Quintanilla LG (2009) Development of a

- naturally miniaturised testing method based on the mitochondrial activity of fern spores: a new higher plant bioassay. *Chemosphere* 77:983–8. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.07.080
- Catala M, Gasulla F, Pradas Del Real AE, et al (2013) The organic air pollutant cumene hydroperoxide interferes with NO antioxidant role in rehydrating lichen. *Environ Pollut* 179:277–284. doi: 10.1016/j.envpol.2013.04.015 [doi]
- Cen H, He Y (2007) Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends Food Sci Technol* 18:72–83. doi: 10.1016/j.tifs.2006.09.003
- Chung KW, Fulton MH, Scott GI (2007) Use of the juvenile clam, *Mercenaria mercenaria*, as a sensitive indicator of aqueous and sediment toxicity. *Ecotoxicol Environ Saf* 67:333–40. doi: 10.1016/j.ecoenv.2006.10.009
- Ciurczack E. (2008) Basic Principles of Near-Infrared Spectroscopy. In: D.A. Burns, E.W. Ciurczack (eds) *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 3^a ed. Taylor & Francis Group,
- Codina JC, Pérez-García A, Romero P, de Vicente A (1993) A comparison of microbial bioassays for the detection of metal toxicity. *Arch Environ Contam Toxicol* 25:250–254. doi: 10.1007/BF00212137
- Connon RE, Geist J, Werner I (2012) Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors (Switzerland)* 12:12741–12771. doi: 10.3390/s120912741
- Corte L, Antonielli L, Roscini L, et al (2011) Influence of cell parameters in Fourier Transform InfraRed spectroscopy analysis of whole yeast cells. *Analyst* 136:2339–2349. doi: 10.1039/c0an00515k
- Corte L, Rellini P, Roscini L, et al (2010) Development of a novel, FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) based, yeast bioassay for toxicity testing and stress response study. *Anal Chim Acta* 659:258–265. doi: 10.1016/j.aca.2009.11.035
- Crane M, Babut M (2007) Environmental quality standards for water framework directive priority substances: challenges and opportunities. *Integr Environ Assess Manag* 3:290–296. doi: 10.1897/IEAM_2006-045.1
- Damásio JB, Barata C, Munné A, et al (2007) Comparing the response of biochemical indicators (biomarkers) and biological indices to diagnose the ecological impact of an oil spillage in a Mediterranean river (NE Catalunya, Spain). *Chemosphere* 66:1206–1216. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.07.055
- Daughton CG, Ternes TA (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environ Health Perspect* 107:907–938. doi: 10.1289/ehp.99107s6907
- Debén S, Aboal JR, Carballeira A, et al (2015) Inland water quality monitoring with native bryophytes: A methodological review. *Ecol Indic* 53:115–124. doi: 10.1016/j.ecolind.2015.01.015
- Depledge MH (1994) The Rational Basis for the Use of Biomarkers as Ecotoxicological Tools. In: *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*, First edit. CRC Press, p 25

- Depledge MH, Amaral-Mendes JJ, Daniel B, et al (1993) The Conceptual Basis of the Biomarker Approach. *Biomarkers* 15–29. doi: 10.1007/978-3-642-84631-1_2
- Dévier MH, Mazellier P, Aït-Aïssa S, Budzinski H (2011) New challenges in environmental analytical chemistry: Identification of toxic compounds in complex mixtures. *Comptes Rendus Chim* 14:766–779. doi: 10.1016/j.crci.2011.04.006
- Domínguez-Morueco N, Moreno H, Barreno E, Catalá M (2014) Preliminary assessment of terrestrial microalgae isolated from lichens as testing species for environmental monitoring: lichen phycobionts present high sensitivity to environmental micropollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 99:35–44. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.10.007
- EEA (2011) Hazardous Substances in Europe’s Fresh and Marine Waters e An Overview. European Environment Agency.
- Eggen RIL, Segner H (2003) The potential of mechanism-based bioanalytical tools in ecotoxicological exposure and effect assessment. *Anal Bioanal Chem* 377:386–396. doi: 10.1007/s00216-003-2059-y
- Escher, B.I.; Leusch FD. (2012) *Bioanalytical Tools in Water Quality Assessment*. IWA Publishing, London, New York
- Feito R, Valcárcel Y, Catalá M (2012) Biomarker assessment of toxicity with miniaturised bioassays: Diclofenac as a case study. *Ecotoxicology* 21:289–296. doi: 10.1007/s10646-011-0790-2
- Fent K (2004) Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology* 205:223–240. doi: 10.1016/j.tox.2004.06.060
- Fraysse B, Mons R, Garric J (2006) Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf* 63:253–267. doi: 10.1016/j.ecoenv.2004.10.015
- Freitag S, Hogan EJ, Crittenden PD, et al (2011) Alterations in the metabolic fingerprint of *Cladonia portentosa* in response to atmospheric nitrogen deposition. *Physiol Plant* 143:107–114. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01484.x
- García-Seoane R, Fernández JA, Villares R, Aboal JR (2018) Use of macroalgae to biomonitor pollutants in coastal waters: Optimization of the methodology. *Ecol Indic* 84:710–726. doi: 10.1016/j.ecolind.2017.09.015
- Gasulla F, De Nova PG, Esteban-Carrasco A, et al (2009) Dehydration rate and time of desiccation affect recovery of the lichenic algae *Trebouxia erici*: Alternative and classical protective mechanisms. *Planta* 231:195–208. doi: 10.1007/s00425-009-1019-y
- George-Ares A, Clark JR (2000) Aquatic toxicity of two Corexit® dispersants. *Chemosphere* 40:897–906. doi: 10.1016/S0045-6535(99)00498-1
- Glassmeyer ST, Koplín DW, Furlong ET, Focazio M (2008) Environmental presence and persistence of pharmaceuticals: An overview. In: *Fate of pharmaceuticals in the environment and in water treatment systems*. CRC Press, Boca Raton, pp 3–51
- Gurbanov R, Gozen AG, Severcan F (2018) Rapid classification of heavy metal-exposed freshwater bacteria by infrared spectroscopy coupled with chemometrics

- using supervised method. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 189:282–290. doi: 10.1016/j.saa.2017.08.038
- Gurbanov R, Unal D (2018) The biomolecular alterations in *Cladonia convoluta* in response to lead exposure. *Spectrosc Lett* 0:1–8. doi: 10.1080/00387010.2018.1533564
- Hampel M, Blasco J, Martín Díaz ML (2016) *Biomarkers and Effects*. Elsevier
- Hashmi MAK, Escher BI, Krauss M, et al (2018) Effect-directed analysis (EDA) of Danube River water sample receiving untreated municipal wastewater from Novi Sad, Serbia. *Sci Total Environ* 624:1072–1081. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.12.187
- Holmqvist N, Stenroth P, Berglund O, et al (2007) Persistent organic pollutants (POP) in a benthic omnivore - A comparison between lake and stream crayfish populations. *Chemosphere* 66:1070–1078. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.06.064
- Holt EA, Miller SW (2011) *Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts* | Learn Science at Scitable. *Nat Educ Knowl* 3:8.
- Janssen C. (1998) *Alternative assays for routine toxicity assessments: a review*, *Ecotoxicol*. Wiley & Sons, London, UK
- Janssen CR, Vangheluwe M, Van Sprang P (2011) A brief review and critical evaluation of the status of microbioassays. *New Microbioassays Routine Toxic Screen Biomonitoring* 27–37. doi: 10.1007/978-1-4615-4289-6_3
- Jinendra B, Tamaki K, Kuroki S, et al (2010) Near infrared spectroscopy and aquaphotomics: Novel approach for rapid in vivo diagnosis of virus infected soybean. *Biochem Biophys Res Commun* 397:685–690. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.007
- Jjemba PK (2006) Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
- Kimball KD, Levin SA (1985) Limitations of Laboratory Bioassays: The Need for Ecosystem-Level Testing. *Bioscience* 35:165–171. doi: 10.2307/1309866
- Kroon F, Streten C, Harries S (2017) A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review.
- Kuroki S, Tsenkova R, Moyankova D, et al (2019) Water molecular structure underpins extreme desiccation tolerance of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Sci Rep* 9:1–12. doi: 10.1038/s41598-019-39443-4
- Kwan KK, Dutka BJ (1990) Simple two-step sediment extraction procedure for use in genotoxicity and toxicity bioassays. *Toxic Assess* 5:395–404. doi: 10.1002/tox.2540050407
- Lam PKS (2009) Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean Coast Manag* 52:348–354. doi: 10.1016/j.ocecoaman.2009.04.010
- Liao C, Piercey-Normore MD, Sorensen JL, Gough K (2010) In situ imaging of usnic acid in selected *Cladonia* spp. by vibrational spectroscopy. *Analyst* 135:3242–3248. doi: 10.1039/c0an00533a

- Lorenz CM (2003) Chapter 4 Bioindicators for ecosystem management, with special reference to freshwater systems. *Trace Met other Contam Environ* 6:123–152. doi: 10.1016/S0927-5215(03)80134-0
- Luo Y, Guo W, Ngo HH, et al (2014) A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.*
- Madigosky SR, Alvarez-hernandez X, Glass J (1991) Lead, Cadmium, and Aluminum Accumulation in the Red Swamp Crayfish. 258:253–258.
- Mark H, Ritchie GE, Roller RW, et al (2002) Validation of a near-infrared transmission spectroscopic procedure, part A: Validation protocols. *J Pharm Biomed Anal.* doi: 10.1016/S0731-7085(01)00567-2
- Martin Ruel S, Choubert JM, Budzinski H, et al (2012) Occurrence and fate of relevant substances in wastewater treatment plants regarding Water Framework Directive and future legislations. *Water Sci Technol* 65:1179–1189. doi: 10.2166/wst.2012.943
- Marugán J, Bru D, Pablos C, Catalá M (2012) Comparative evaluation of acute toxicity by *Vibrio fischeri* and fern spore based bioassays in the follow-up of toxic chemicals degradation by photocatalysis. *J Hazard Mater* 213–214:117–22. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.01.075
- McFeters GA, Bond PJ, Olson SB, Tchan YT (1983) A comparison of microbial bioassays for the detection of aquatic toxicants. *Water Res* 17:1757–1762. doi: 10.1016/0043-1354(83)90197-5
- Meisurova AF, Khizhnyak SD, Pakhomov PM (2009) IR spectral analysis of the chemical composition of the lichen *Hypogymnia physodes* to assess atmospheric pollution. *J Appl Spectrosc* 76:420–426. doi: 10.1007/s10812-009-9179-x
- NCR (1987) Committee on Biological Markers of the National Research Council, 1987. Biological markers in environmental health research. In: *Environ. Health Perspect.* pp 3–9
- NCR (1991) Committee on Animals as Monitors on Environmental Hazards. National Research Council. In: *Animals as sentinels of environmental health hazards.* National Academy Press, Washington, p 160
- Ozaki Y, Genkawa T, Futami Y (2016) Near-infrared spectroscopy. In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry.*
- Pandey S, Parvez S, Sayeed I, et al (2003) Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Sci Total Environ* 309:105–115. doi: 10.1016/S0048-9697(03)00006-8
- Pasquini C (2003) Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. *J Braz Chem Soc* 14:198–219. doi: 10.1590/S0103-50532003000200006
- Pasquini C (2018) Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives – A review. *Anal Chim Acta* 1026:8–36. doi: 10.1016/j.aca.2018.04.004

- Pedrazzani R, Bertanza G, Brnardić I, et al (2019) Opinion paper about organic trace pollutants in wastewater: Toxicity assessment in a European perspective. *Sci Total Environ* 651:3202–3221. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.10.027
- Peinado MT, Mariscal A, Carnero-Varo M, Fernández-Crehuet J (2002) Correlation of two bioluminescence and one fluorogenic bioassay for the detection of toxic chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf* 53:170–177. doi: 10.1006/eesa.2002.2177
- Price P, Dhein E, Hamer M, et al (2012) A decision tree for assessing effects from exposures to multiple substances. *Environ Sci Eur* 24:1–12. doi: 10.1186/2190-4715-24-26
- Rand GM, Petrocelli SR (1985) *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications*. Hemisphere Publishing, New York, NY, United States
- Reid BJ, Jones KC, Semple KT (2000) Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments - A perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environ Pollut* 108:103–112. doi: 10.1016/S0269-7491(99)00206-7
- Roggo Y, Chalus P, Maurer L, et al (2007) A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J Pharm Biomed Anal* 44:683–700. doi: 10.1016/j.jpba.2007.03.023
- Sanderson H, Johnson DJ, Reitsma T, et al (2004) Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters. 39:158–183. doi: 10.1016/j.yrtph.2003.12.006
- Schlenk D (1999) Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Mar Pollut Bull* 39:48–53. doi: 10.1016/S0025-326X(99)00015-6
- Takahashi H, French SW, Wong PTT (1991) Alterations in Hepatic Lipids and Proteins by Chronic Ethanol Intake: A High-Pressure Fourier Transform Infrared Spectroscopic Study on Alcoholic Liver Disease in the Rat. *Alcohol Clin Exp Res* 15:219–223. doi: 10.1111/j.1530-0277.1991.tb01859.x
- Tejeda-Vera R, López-López E, Sedeño-Díaz JE (2007) Biomarkers and bioindicators of the health condition of *Ameca splendens* and *Goodea atripinnis* (Pisces: Goodeidae) in the Ameca River, Mexico. *Environ Int* 33:521–31. doi: 10.1016/j.envint.2006.11.018
- Timbrell J (1998) Biomarker in toxicology. In: *Toxicology*. pp 129:1–12
- Tosti E (2012) Best Biomarker and Bioindicator for Marine Environmental Pollution. *J Mar Sci Res Dev*. doi: 10.4172/2155-9910.1000e101
- Traba HM, Domínguez-Morueco N, Barreno E, Catalá M (2017) Lichen microalgae are sensitive to environmental concentrations of atrazine. *J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes* 52:223–228. doi: 10.1080/03601234.2016.1270679
- Tsenkova R (2008) Aquaphotomics: The Extended Water Mirror Effect Explains Why Small Concentrations of Protein in Solution Can Be Measured with near Infrared Light. *NIR news* 19:13–14. doi: 10.1255/nirn.1079
- Tsenkova R (2007) AquaPhotomics: Water Absorbance Pattern as a Biological Marker for Disease Diagnosis and Disease Understanding. *NIR news* 18:14–16. doi:

10.1255/nirn.1014

- Tsenkova R (2009a) Aquaphotomics: Dynamic Spectroscopy of Aqueous and Biological Systems Describes Peculiarities of Water. *J Near Infrared Spectrosc* 17:303–313.
- Tsenkova R (2009b) Introduction aquaphotomics: Dynamic spectroscopy of aqueous and biological systems describes peculiarities of water. *J Near Infrared Spectrosc* 17:303–314. doi: 10.1255/jnirs.869
- van der Grinten E, Pikkemaat MG, van den Brandhof EJ, et al (2010) Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. *Chemosphere* 80:1–6. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.04.011
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57–149. doi: 10.1016/S1382-6689(02)00126-6
- Vasseur P, Cossu-Leguille C (2003) Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environ Int* 28:711–717. doi: 10.1016/S0160-4120(02)00116-2
- Vazquez-Roig P, Andreu V, Onghena M, et al (2011) Assessment of the occurrence and distribution of pharmaceuticals in a Mediterranean wetland (L'Albufera, Valencia, Spain) by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 400:1287–1301. doi: 10.1007/s00216-011-4826-5
- Wadhia K, Thompson KC (2007) Low-cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotests for potential implementation of the Water Framework Directive. *TrAC - Trends Anal Chem* 26:300–307. doi: 10.1016/j.trac.2007.01.011
- Walker C, Kaiser K, Klein W, et al (1998) 13th meeting of the Scientific Group on Methodologies for the Safety Evaluation of Chemicals (SGOMSEC): Alternative testing methodologies for ecotoxicity. *Environ Health Perspect* 106:441–451. doi: 10.1289/ehp.98106441
- Waykar B, Deshmukh G (2012) Evaluation of bivalves as bioindicators of metal pollution in freshwater. *Bull Environ Contam Toxicol* 88:48–53. doi: 10.1007/s00128-011-0447-0
- Werner I, Deanovic LA, Miller J, et al (2010) Use of vegetated agricultural drainage ditches to decrease toxicity of irrigation runoff from tomato and alfalfa fields in California, USA. *Environ Toxicol Chem* 29:2859–2868. doi: 10.1002/etc.356
- Westad F, Schmidt A, Kermit M (2008) Incorporating chemical band-assignment in near infrared spectroscopy regression models. *J Near Infrared Spectrosc* 16:265–273. doi: 10.1255/jnirs.786
- White GJ (2004) Selection of ecological indicators for monitoring terrestrial systems. In: G.B. Wiersma (ed) *Environmental Monitoring*, CRC Press. Boca Raton, FL, pp 263–82
- WHO (1993) International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. In: *Environmental Health Criteria* 155, World Health Organization, Geneva.

- Wolska L, Sagajdakow A, Kuczyńska A, et al (2007) Application of ecotoxicological studies in integrated environmental monitoring: Possibilities and problems. *TrAC - Trends Anal Chem* 26:332–344. doi: 10.1016/j.trac.2006.11.012
- Zhou Q, Zhang J, Fu J, et al (2008) Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal Chim Acta* 606:135–150. doi: 10.1016/j.aca.2007.11.018

Conclusiones

-Los biomarcadores de campo permiten una evaluación integral de la contaminación ambiental siendo una herramienta complementaria, la cual permite extrapolar los resultados obtenidos en los bioensayos de laboratorio.

El biomarcador de campo de peroxidación lipídica puede ser apropiado para los agroecosistemas mediterráneos ibéricos puesto que detecta daño oxidativo en especies no objetivo como el cangrejo rojo americano y la encina al estar expuestos a contaminantes tales como pesticidas y medicamentos.

-Analizar la producción de radicales libres intracelulares en ficobiontes rehidratados con distintos tratamientos permite obtener datos de contaminación ambiental de manera muy rápida, lo que constituye un enfoque innovador puesto que no hay microbioensayos donde se utilicen organismos adaptados a la anhidrobiosis.

-La utilización de microalgas aéreo-terrestres permite detectar contaminantes incluso a concentraciones más bajas que las ambientales y el análisis puede realizarse en un amplio tipo de muestras.

-La espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-NIRS) es un método alternativo a los métodos convencionales que nos permite asociar la huella metabólica obtenida a situaciones de estrés. Se comprueban cambios en los lípidos cuando los ficobiontes son deshidratados, en concreto los ácidos grasos aumentan. En este estado, también aparecen las proteínas. La deshidratación le supone por tanto un cambio en sus metabolitos como mecanismo constitutivo y de protección.

-El estudio de la estructura del agua mediante la técnica FT-NIRS en ficobiontes, nos permite analizar su tolerancia a la deshidratación y comparar con otros organismos tolerantes. Este análisis es un espejo de los cambios metabólicos que se van produciendo en los ciclos deshidratación/rehidratación y puede tener importantes aplicaciones medioambientales.