



Doctoral Thesis

Herbicide effects on *Chlamydomonas reinhardtii* assessed on physiological and molecular levels

Author(s):

Nestler, Holger

Publication Date:

2012

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007578753> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 20396

**Herbicide effects on *Chlamydomonas reinhardtii* assessed on
physiological and molecular levels**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

HOLGER NESTLER

Dipl.-Geoökol., Technische Universität Bergakademie Freiberg

born on August 11, 1981 in Zschopau
citizen of Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Rik I. L. Eggen, examiner
Dr. Marc J.-F. Suter, co-examiner
Prof. Dr. Jukka Jokela, co-examiner
Dr. Mechthild Schmitt-Jansen, co-examiner

2012

Summary

Pesticides are widely used to control the growth and proliferation of unwanted target organisms, such as weed, fungi or insects. Following application, particularly in agriculture, substantial amounts of these anthropogenic compounds are introduced into freshwater ecosystems which raises concerns about potentially detrimental effects on non-target organisms. Since herbicides constitute the largest proportion of pesticides used, freshwater algae, which are part of the basis of the ecologically highly relevant aquatic food web, might be particularly at risk. To assess this risk, ecotoxicological testing procedures are typically employed. This involves standardized toxicity testing based on growth inhibition of unicellular algae. Since this endpoint is highly integrative, no information regarding mechanisms of toxic action can be obtained. This understanding, however, is crucial for addressing current and future challenges in ecotoxicology. To obtain it, it is necessary to analyze physiological, biochemical and subcellular molecular effects caused by the investigated compounds which underlie the impacts on the whole-organism level.

The overall goal of this thesis was to investigate the effects of herbicides on green algae with a focus on assessing and linking physiological and biochemical endpoints as well as variations on the protein level, to elucidate the exposure effects and toxic mechanisms of these compounds. The unicellular model organism *Chlamydomonas reinhardtii* was selected as a representative of the green algae. It was exposed to the model herbicides paraquat, diuron and norflurazon, each representing specific toxic mechanisms of action.

Specific physiological and biochemical endpoints were selected. These were pigment content, maximum and effective photosystem II quantum yield, ATP content, esterase and oxidative activity, thus covering a wide range of cellular parameters in the alga. They were investigated in fast and simple setups and compiled in a novel multiple-endpoint assay, in combination with the assessment of growth (chapter 2). The endpoints were measured at different time points during exposure of up to 24 h. For all endpoints and exposure durations effective concentrations inducing 50% response (EC50s), as well as lowest observable effect concentrations (LOECs) were determined when possible. The multiple-endpoint assay provided a highly detailed view of the concentration and time-dependent effects induced by the selected herbicides, thereby confirming and expanding our knowledge about their toxic mechanisms. Furthermore, a number of physiological and biochemical endpoints responded earlier or stronger to the exposures than the integrative endpoint growth. As the various endpoints responded highly specific to exposure to the three herbicides, unique patterns were observed which reflected the different mechanisms of toxicity.

Since the proteome of an organism sensitively shows specific alterations upon exposure, a differential proteome profiling analysis was performed for the assessment of herbicide effects on the subcellular level.

For this purpose a shotgun proteomics method, the multidimensional protein identification technology (MudPIT), was applied and combined with spectral counting quantification and G-test statistics to reveal significant changes in protein abundance. The required computational analysis steps were implemented in a pipeline developed for this work, using public domain software and automation via scripting (chapter 3). Based on the results of the multiple-endpoint assay, two exposure concentrations of each herbicide representing high and low stress levels were selected for analysis. Under these conditions significant changes were detected for 149-254 proteins of diverse cellular function and location (chapter 4). Among the variations found were expected ones, such as glutathione-*S*-transferases or various thioredoxins, as well as novel candidate markers of exposure, including the photosystem II subunit PsbR and the VIPP1 protein. Functional enrichment analysis on the lists of significantly changed proteins allowed identification of functional protein groups that responded to the exposures. Overall, the results showed activation or suppression in a variety of metabolic pathways and protein complexes, such as various antioxidant defense systems, pigment synthesis and the photosystems. Part of these effects could be linked to observations made using the multiple-endpoint assay, including those reflecting the mechanisms of action of the model herbicides. Furthermore, significant and complex proteome responses to the low concentration conditions demonstrated the high sensitivity of the proteome level compared to physiological and biochemical endpoints. The different exposure conditions induced some common variations on the protein level. Many changes, however, were specific to particular conditions, indicating the high specificity of the proteome response.

In conclusion, this thesis contributed to the understanding of adverse effects induced by the herbicides paraquat, diuron and norflurazon in green algae, and of the underlying toxic mechanisms. The particular importance and usefulness of linking different biological levels influenced by exposures was demonstrated. Both approaches, the multiple-endpoint assay as well as proteome profiling, are promising tools for future ecotoxicological research on toxic mechanisms in green algae, as well as risk assessment of herbicides and other phytotoxicants.

Zusammenfassung

Pestizide werden vielfältig eingesetzt um das Wachstum und die Vermehrung schädlicher Zielorganismen wie Unkräuter, Pilze oder Insekten zu hemmen. Infolge ihrer Anwendung, besonders in der Landwirtschaft, gelangen beträchtliche Mengen dieser anthropogenen Verbindungen in Süßwasserökosysteme. Dies lässt Bedenken aufkommen hinsichtlich möglicher Beeinträchtigungen von Nicht-Zielorganismen. Da Herbizide den grössten Anteil der verwendeten Pestizide stellen, sind Algen, welche Teil der Basis des ökologisch hochrelevanten aquatischen Nahrungsnetzes sind, möglicherweise einem besonderen Risiko ausgesetzt. Um dieses Risiko abzuschätzen, werden üblicherweise ökotoxikologische Testverfahren angewendet. Dies beinhaltet standardisierte Toxizitätstests, welche auf der Wachstumsinhibition einzelliger Algen basieren. Da dieser Endpunkt sehr integrativ ist, werden keine Informationen hinsichtlich toxischer Mechanismen erhalten. Dieses Verständnis ist jedoch entscheidend, damit aktuellen und zukünftigen Herausforderungen in der Ökotoxikologie begegnet werden kann. Um es zu erlangen ist es erforderlich, die von den untersuchten Verbindungen hervorgerufenen physiologischen, biochemischen und subzellulären molekularen Effekte zu analysieren, welche den Auswirkungen auf der Organismenebene zu Grunde liegen.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte von Herbiziden auf Grünalgen zu untersuchen. Der Schwerpunkt lag auf der Erfassung und Verbindung physiologischer und biochemischer Endpunkte sowie Veränderungen auf der Proteinebene, um die Expositionseffekte und toxischen Wirkmechanismen dieser Verbindungen aufzuklären. Der einzellige Modellorganismus *Chlamydomonas reinhardtii* wurde als Vertreter der Grünalgen ausgewählt und wurde mit den Modellherbiziden Paraquat, Diuron und Norflurazon exponiert. Jedes dieser Herbizide repräsentiert spezifische toxische Wirkmechanismen.

Spezifische physiologische und biochemische Endpunkte wurden ausgewählt. Diese umfassten Pigmentgehalt, maximale und effektive Quantenausbeute des Photosystems II, ATP-Gehalt, Esterase- sowie oxidative Aktivität. Somit wurde ein breites Spektrum zellulärer Parameter der Algen abgedeckt. Diese Messgrößen wurden in schnellen und einfachen Verfahren bestimmt und in einer neuartigen Testbatterie aus mehreren Endpunkten mit der Bestimmung des Wachstums kombiniert (Kapitel 2). Die Endpunkte wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während der Expositionsdauer von bis zu 24 h gemessen. In allen Fällen, die dies erlauben, wurden die mittlere effektive Konzentration (EC50) und die niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung (LOEC) bestimmt. Die Testbatterie lieferte einen hochdetaillierten Überblick über die konzentrations- und zeitabhängigen Effekte, die durch die ausgewählten Herbizide verursacht werden. Dadurch wurden die Kenntnisse über deren toxische Mechanismen bestätigt und erweitert. Weiterhin zeigten

einige physiologische und biochemische Endpunkte frühere oder stärkere Effekte an als der integrative Wachstumsendpunkt. Da die verschiedenen Endpunkte hochspezifisch auf die Exposition mit den drei Herbiziden reagierten, wurden Effektmuster beobachtet, welche die verschiedenen toxischen Mechanismen widerspiegeln.

Da das Proteom eines Organismus empfindlich mit spezifischen Veränderungen auf Expositionen reagiert, wurde eine differenzielle Proteomikanalyse durchgeführt um die Effekte der Herbizide auf subzellulärer Ebene zu beleuchten. Zu diesem Zweck wurde eine „shotgun“-Proteomikmethode, die „multidimensional protein identification technology“ (MudPIT), eingesetzt. Die Quantifizierung mittels sogenanntem „spectral counting“ (Spektrennaddierung) wurde mit G-Test-Statistik kombiniert um signifikante Änderungen von Proteinmengen zu bestimmen. Die hierfür benötigten rechnergestützten Datenanalyseschritte wurden mit Public-Domain-Software und Automatisierung durch Scripting implementiert (Kapitel 3). Auf der Grundlage der Ergebnisse der Testbatterie wurden je zwei Expositionskonzentrationen der Herbizide für die Analyse ausgewählt, welche jeweils hohe bzw. niedrige Stressniveaus darstellen. Unter diesen Bedingungen wurden signifikante Änderungen für 149-254 Proteine mit vielfältiger zellulärer Funktion und Lokalisation festgestellt (Kapitel 4). Veränderungen wie zum Beispiel von Glutathion-S-Transferasen oder verschiedenen Thioredoxinen wurden erwartet. Es wurden aber auch neue potentielle Expositionsmarker gefunden, wie die Photosystem II-Untereinheit PsbR und das VIPP1-Protein. Die „Functional Enrichment“-Analyse der signifikant veränderten Proteine führte zur Identifizierung von Gruppen funktionell zusammenhängender Proteine welche auf die Expositionen reagierten. Insgesamt zeigten die Ergebnisse die Hoch- und Herunterregulationen in einer Vielfalt von Stoffwechselwegen und Proteinkomplexen, wie zum Beispiel verschiedenen antioxidierenden Abwehrsystemen, der Pigmentsynthese und den Photosystemen. Ein Teil dieser Effekte konnte mit Ergebnissen der physiologischen und biochemischen Endpunkte verbunden werden, einschliesslich solcher, welche die Wirkmechanismen der Herbizide widerspiegeln. Es wurden auch bei niedrigen Expositionskonzentrationen signifikante wie komplexe Proteomänderungen festgestellt, was die hohe Empfindlichkeit der Proteinebene verglichen mit den getesteten physiologischen und biochemischen Endpunkten zeigte. Bestimmte Proteomänderungen traten bei mehreren Expositionsbedingungen auf. Da viele Änderungen allerdings auf bestimmte Bedingungen beschränkt waren, wurde die hohe Spezifität der Proteomreaktion verdeutlicht.

Diese Arbeit hat zum Verständnis der schädigenden Effekte sowie der toxischen Wirkmechanismen, der Herbizide Paraquat, Diuron und Norflurazon in Grünalgen beigetragen. Die Bedeutung und Nützlichkeit der Berücksichtigung verschiedener biologischer Ebenen, die durch die Expositionen beeinflusst werden, wurde demonstriert. Die Testbatterie aus mehreren Endpunkten sowie die Proteomanalyse sind vielversprechende Grundlagen für zukünftige ökotoxikologische Forschung in Bezug auf Wirkmechanismen in Grünalgen und die Risikoabschätzung von Herbiziden und anderer phytotoxischer Verbindungen.