

Universidad de Zaragoza

Facultad de Ciencias



Estudio de la respuesta al γ -lindano en
cianobacterias: cambios transcripcionales de
genes potencialmente implicados.

Study of the response to γ -lindane in
cyanobacteria: transcriptional changes of
genes potentially involved.

Proyecto de Fin de Grado en Biotecnología dirigido por Emma
Sevilla Miguel.

Carolina Castro López

Curso 2015/2016

Índice

1. Resumen/Abstract.....	1
2. Introducción.....	2
2.1.Lindano.....	2
2.2.Lindano en Aragón	3
2.2.1. Panorama actual.....	3
2.3.Ruta de degradación de lindano en bacterias y cianobacterias	4
2.3.1. Ruta de degradación de lindano en <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	4
2.3.2. Ruta de degradación de lindano en <i>Anabaena</i>	5
3. Objetivos.....	5
4. Materiales y métodos.....	6
4.1.Cepas y medios de cultivo utilizados.....	6
4.2.Estudio del efecto del γ-lindano.....	6
4.2.1. Estudios de tolerancia a γ-lindano.....	6
4.2.2. Cultivos para estudios de expresión génica	6
4.3.Métodos analíticos.....	7
4.3.1. Determinación de proteína	7
4.3.2. Determinación de clorofila	7
4.4.Aislamiento de RNA total de <i>Anabaena</i> PCC7120	7
4.4.1. Toma de muestras para alineamiento de RNA de <i>Anabaena</i> PCC7120	7
4.4.2. Extracción de RNA	8
4.4.3. Electroforesis de RNA	9
4.4.4. Comprobación de la pureza de RNA aislado	9
4.4.5. Retrotranscripción	9
4.4.6. Estudio de la amplificación de fragmentos de genes de interés.....	10
4.5.Estudios “in silico”	10
5. Resultados	11
5.1.Tolerancia al γ-lindano de <i>Anabaena</i> PCC7120	11
5.1.1. Curvas de crecimiento a distintas concentraciones de γ-lindano	11
5.1.2. Efecto de la concentración de γ-lindano sobre el contenido de clorofila <i>a</i> y proteína total.....	11
5.2.Estudio de la expresión génica mediante PCR a Tiempo Real	12
5.2.1. Expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo en presencia de γ-lindano	12

5.2.2. Estudio de expresión de genes potencialmente implicados en la degradación de γ -lindano	14
5.3. Estudio de la expresión de genes en <i>Microcystis aeruginosa</i> como respuesta a la presencia de γ -lindano	17
5.4. Estudio de la tolerancia al estrés oxidativo producido por γ -lindano de una cepa de <i>Anabaena</i> PCC7120 que sobreexpresa FurC.....	18
6. Discusión.....	19
6.1.Tolerancia de <i>Anabaena</i> PCC7120 a γ -lindano	19
6.2.Expresión génica	19
6.2.1. Efecto del DMSO y estés oxidativo	20
6.2.2. Genes <i>lin</i>	20
6.2.3. Genes del metabolismo del nitrógeno	21
6.2.4. <i>Microcystis aeruginosa</i>	21
6.3.Efecto de FurC	22
7. Conclusiones/Conclusions.....	23
Bibliografía	24
8. Material suplementario	S-1
8.1.Ruta de degradación en <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	S-1
8.2.Cebadores utilizados en los estudios de Real Time PCR	S-2
8.3.Alineamiento de secuencias.....	S-2
8.3.1. Alineamiento <i>linB Anabaena</i> y <i>linB Sphingomonas paucimobilis</i>	S-2
8.3.2. Alineamiento <i>linR Anabaena</i> y <i>linR Sphingomonas paucimobilis</i>	S-3
8.3.3. Alineamiento <i>linE Anabaena</i> y <i>linE Sphingomonas paucimobilis</i>	S-3
8.4.Contexto genético	S-4
8.5.Árboles filogenéticos.....	S-4
8.5.1. Árbol filogenético <i>linB</i>	S-4
8.5.2. Árbol filogenético <i>linE</i>	S-5

1. Resumen:

El lindano es un pesticida organoclorado con gran persistencia en los ecosistemas y con consecuencias graves para la salud humana y el ambiente debido a su bioacumulación. El isómero comúnmente utilizado es el isómero gamma. En Aragón actualmente hay un grave problema de contaminación en la zona de Sabiñánigo debido a la actividad años atrás de la fábrica Inquinosa, que no almacenó de forma correcta los residuos. Los vertederos de Sardás y Bailín (en los que se almacenaron los residuos) están próximos al río Gállego en el que se ha encontrado frecuentemente niveles del pesticida por encima de los permitidos por la legislación vigente. En este trabajo se ha llevado a cabo el estudio de la expresión génica de distintos genes potencialmente implicados en la respuesta de dos cianobacterias al γ -lindano. Los resultados obtenidos indican que *Anabaena* PCC7120 tolera bien la presencia de lindano a tiempos cortos, ya que los datos de crecimiento, el contenido de clorofila *a* y el contenido de proteínas indican solo una ligera afectación. Por otra parte, se ha demostrado que el lindano produce estrés oxidativo a los organismos de estudio (*Anabaena* y *Microcystis aeruginosa* PCC7806) mostrando un aumento en la expresión de genes que se inducen como respuesta al estrés oxidativo (*furC* y *prxA*). La ruta de degradación de lindano en *Anabaena* se desconoce. En este trabajo se han relacionado genes que codifican para enzimas presentes en la ruta de degradación de *Sphingomonas paucimobilis* con genes presentes en el genoma de *Anabaena*, los cuales podrían corresponder con los homólogos de la ruta de degradación en *Anabaena*. Además, se ha utilizado una cepa con sobreexpresión de un regulador transcripcional, *furC*, que nos ha permitido observar que la sobreexpresión de esta proteína le confiere a la cianobacteria un aumento de la tolerancia al pesticida con respecto a la cepa silvestre.

2. Abstract:

Lindane is an organochlorine pesticide with great persistence and with serious consequences for human health and the environment due to its bioaccumulation. The isomer most commonly used is the gamma isomer. Aragón is a large polluted area due to the activity of the factory Inquinosa located in Sabiñánigo, which did not properly treat the residues. The dumping sites Sardás and Bailín (where the waste is stored) are close to Gállego's river in which it was frequently found the presence of the pesticide. The aim of this study is to characterize, in cyanobacteria able to degrade the pesticide, the effects of γ -lindane and describe changes in gene expression induced in the presence of the pesticide. The results show that *Anabaena* PCC7120 tolerate well the presence of lindane at short times, as observed in growth curves, chlorophyll content and protein content. Moreover, it has been shown that lindane produces oxidative stress in the studied organisms (*Anabaena* and *Microcystis* PCC7806), and increase the expression of genes related to oxidative stress responses (*furC* and *prxA*). Lindane's degradation pathway in *Anabaena* is unknown. In this paper we have related genes encoding enzymes involved in lindane degradation pathway of *Sphingomonas paucimobilis* with genes in the genome of *Anabaena* that could correspond with counterparts degradation pathway in *Anabaena*. In addition, we used an overexpressing FurC strain, which shows an increase in pesticide tolerance with respect to the wild type strain.

2. Introducción:

2.1. Lindano:

Después de la Segunda Guerra Mundial comenzó la utilización masiva de pesticidas organoclorados no sólo en agricultura, sino también como agentes de control de parásitos del hombre y de animales (Vijgen et al., 2011). La persistencia de los pesticidas en el medio ambiente puede ser beneficiosa para el agricultor por su largo efecto residual, pero es perjudicial para el medio ambiente ya que aumenta la exposición de los organismos a esas sustancias tóxicas.

Uno de los compuestos más utilizados fue el lindano, uno de los cinco isómeros del hexaclorociclohexano (HCH), concretamente el isómero gamma. La diferencia entre los isómeros se encuentra en la unión de los átomos de cloro a los átomos de la molécula de ciclohexano (Solomon et al., 2015), existiendo ocho isómeros distintos.

Los problemas derivados del uso de lindano son debidos no solo a su persistencia sino que, como todos los organoclorados, además de ser tóxico tiene la capacidad de ser almacenado en los seres vivos (bioacumulación) con consecuencias graves para la salud humana y para el ambiente (Chaurasia, Adhya, & Apte, 2013). La exposición a HCH puede ser por ingestión, por inhalación o por contacto y sus efectos tóxicos dependen de la cantidad de isómeros presentes y principalmente de la cantidad de isómero gamma que contenga. Si se ingiere en grandes cantidades, el HCH provoca dolores de cabeza, cansancio, debilidad, malestar, insomnio, diarreas, vómito y fiebre, (e incluso la muerte, si se tomara en muy grandes cantidades) (Sangwan et al., 2012). A pequeñas dosis, pero en exposiciones largas (toxicidad crónica) causa problemas hepáticos, renales, hormonales, sanguíneos (anemias). Se ha visto que causa alteraciones endocrinas y daños en el sistema nervioso central, donde interfiere con la función del neurotransmisor ácido γ-aminobutírico (GABA) por interacción con su receptor. Por otro lado, se ha encontrado que en alguna especie animal resulta cancerígeno, y se podría pensar que también lo puede ser para el hombre, aunque esto no está demostrado todavía. La OMS recomienda tratar el HCH y sus isómeros como si fuesen cancerígenos (Sangwan et al., 2012; Nolan et al., 2012).

Desde el punto de vista ambiental, al ser un compuesto apolar (Prathap et al., 2015), el HCH puede infiltrarse en la materia blanca, rica en lípidos, del cerebro (Wooltorton, 2003). Además, se biodegrada lentamente y es muy estable en condiciones ambientales normales. Por lo tanto, el HCH se almacena fácilmente en los seres vivos y en el ambiente. El lindano sólido puede degradarse bajo condiciones aeróbicas. A pesar de todo esto, durante muchos años no se han tomado en serio los peligros que podía conllevar el uso del HCH y en muchos lugares, entre ellos el País Vasco y Aragón, ha sido vertido al medio ambiente sin ningún tipo de control. Hoy día nos damos cuenta de la necesidad de solucionar los problemas originados por estos vertidos, y de la dificultad de hacerlo ya que, todavía no existe un proceso viable para destruir con seguridad el lindano mezclado con tierra. Fue considerado en el Convenio de Estocolmo (tratado global para la protección de la salud humana y el medio ambiente frente a los productos químicos que persisten

expuestos de manera prolongada en el medio ambiente y adquieren una amplia distribución geográfica, pasando a formar parte de los tejidos adiposos de los seres humanos y animales) en 2004 como compuesto persistente y prohibido su uso en la mayoría de los países desarrollados.

2.2. Lindano en Aragón:

En la cuenca del río Gállego se construyeron aprovechamientos hidroeléctricos a comienzos del siglo XX, lo cual favoreció la instalación de numerosas industrias en el entorno de Sabiñánigo, muchas de las cuales se dedicaron a la fabricación de productos químicos (ácido sulfúrico, aluminio electrolítico, cloro, ácido clorhídrico, HCH, fósforos, etc.). Inquinosa, una empresa productora de lindano, se estableció en Sabiñánigo en 1975. Los residuos de HCH producidos en la fabricación del lindano fueron depositados durante años en varios puntos, entre ellos el vertedero de Sardás y de Bailín. En 1987 comenzaron las primeras denuncias por las irregularidades en los vertidos y la contaminación de río Gállego, terminando con su cierre en 1989. Durante el proceso de fabricación del lindano aproximadamente el 85% de los productos son isómeros no comercializables, estos son los que constituyen el grueso de los vertidos. El único isómero que se comercializaba es el γ, el resto no estaban permitidos debido precisamente a su alta persistencia. En el vertedero de Sardás, se depositaron sin ningún tipo de medida de control (impermeabilización, captación de lixiviados, depuración de aguas, etc) todos los residuos industriales generados en la zona, junto con residuos urbanos y escombros de construcción. Este vertedero permaneció en uso hasta 1987, aun cuando a partir de 1984 Inquinosa comenzó a verter en el nuevo vertedero municipal de Bailín. Así pues, durante más de 30 años los residuos industriales de las empresas radicadas en Sabiñánigo se fueron depositando en estos dos vertederos. Ambos vertederos, Sardás y Bailín, están próximos al río Gállego, y en sus aguas se ha detectado puntualmente la presencia de isómeros de HCH (Fernández et al., 2013). Las concentraciones encontradas motivaron que, en diciembre de 1988, la Diputación General de Aragón (DGA) prohibiese el depósito de residuos tóxicos y peligrosos, procedentes de la fabricación de lindano en los vertederos de la zona, y que la Confederación Hidrográfica del Ebro (CHE), prohibiese el vertido de aguas residuales procedentes de la fabricación de lindano. Durante el 2005 se detectó residuo libre de HCH y otros organoclorados en los piezómetros de control situados aguas abajo del vertedero de Bailín y, en febrero de 2009, se comenzaron a detectar residuos libres de HCH en la base del talud de la carretera que pasa junto al vertedero de Sardas. El verano de 2014 las aguas volvieron a bajar llenas de residuos de pesticida y el Gobierno de Aragón tuvo que prohibir el consumo de agua corriente, esto fue debido al traslado de residuos del viejo vertedero a la nueva celda de seguridad, con lo que al romper las zonas en las que el contaminante estaba bien compartimentalizado y al coincidir con un periodo de grandes lluvias se produjo fuga del pesticida al río.

2.2.1. Panorama actual:

En particular, el problema de los suelos contaminados con HCH no parece tener una solución clara hoy día. Se han decidido almacenar las tierras contaminadas en una Celda de Seguridad mientras se encuentre una tecnología adecuada. Esta medida servirá para

eliminar los daños ambientales y de salud que podrían provocar estas tierras en el periodo de búsqueda del sistema a utilizar.

Vertedero de Sardás: Debido a la acumulación de residuos sólidos ha tenido lugar la lixiviación de contaminantes al acuífero. Se está llevando a cabo una monitorización y un seguimiento con una red piezométrica, además del bombeo y extracción del residuo líquido. El estado en el embalse de Santa Ana presenta gran cantidad de lixiviados que forman una pluma contaminante de isómeros en forma de polvo y en fase líquida más densa que el agua (DNAPL por sus siglas en inglés: *dense non-aqueous phase liquid*)

Vertedero de Bailín: En el caso del vertedero de Bailín, la superficie se encuentra limpia y no hay presencia de residuos sólidos. Se lleva a cabo el control de los niveles de HCH con una red piezométrica y se están buscando soluciones para las bolsas de DNAPL producidas en el interior de la roca madre. Potencialmente puede darse un flujo de DNAPL al río Gállego situado únicamente a 800 metros, aunque hay canalizaciones a bolsas de seguridad.

Como planes futuros se encuentra el sellado de celda, desmantelamiento de las instalaciones que todavía contienen residuos tóxicos y restauración de la vegetación.

2.3. Ruta degradación de lindano en bacterias y cianobacterias.

A pesar de la complejidad estructural del lindano, existen distintos microorganismos capaces de degradarlo y utilizarlo como fuente de carbono y energía para su metabolismo. Esto es debido a que estos microorganismos contienen rutas metabólicas compuestas por enzimas capaces de degradar estos compuestos. Entre estos microorganismos encontramos algunas bacterias como *Sphingomonas paucimobilis* y algunas cianobacterias como *Anabaena*.

2.3.1. Ruta degradación de lindano en *Sphingomonas paucimobilis*:

Sphingomonas paucimobilis es una bacteria estrictamente aerobia, gram-negativa, catalasa positiva y oxidasa positiva capaz de degradar diferentes isómeros de lindano (Sangwan et al., 2012). El proceso comienza con una deshidrocloración llevada a cabo por una deshidroclorinasa (*linA*), posteriormente actúa la haloalcano deshalogenasa (*linB*) y por último tiene lugar una deshidrogenación mediada por una deshidrogenasa (*linC/linX*) con la formación de 2,5-diclorohidroquinona. La 2,5-diclorohidroquinona es convertida por la ruta inferior en succinil-coA y acetil-coA por la acción de distintas enzimas. La declorinasa reductiva (*linD*) es la responsable de la eliminación de átomos de cloro de la molécula, posteriormente se produce la escisión del anillo por una oxigenasa (*linE*), y finalmente actúan una maleylacetato reductasa (*linF*), una acil-coA transferasa (*linG, H*) y por último una tiolasa (*linJ*). Finalmente, succinil-coA y acetil-coA entrarán en el ciclo de Krebs y serán utilizados como fuente de carbono y energía, habiendo reducido por completo el lindano a CO₂ y H₂O (**figura 8 Material suplementario**). Los genes *linA*, *linB*, *linC* se expresan de manera constitutiva, mientras que otros como *linE* o *linD* pueden ser inducidos en presencia de determinados intermediarios metabólicos por la transcripción de factores transcripcionales como *linR*. (Sangwan et al., 2012; Nagata et al., 2007; Endo et al., 2005).

2.3.2. Ruta degradación de lindano en *Anabaena*:

Las cianobacterias son organismos fotoautótrofos que se encuentran presentes en una gran variedad de lugares. Algunas de ellas, comparten con distintas bacterias la habilidad de tomar el N₂ del aire, y reducirlo a amonio (NH₄⁺), incorporando nitrógeno a la cadena trófica (Kuritz, 1998). Se ha demostrado que las cianobacterias pueden ser organismos muy versátiles a usar en fitoremediaci^{on} puesto que pueden acumular y degradar compuestos tóxicos. Concretamente, en diversos estudios se ha comprobado que son capaces de degradar el lindano (Chaurasia et al., 2013; Sangwan et al., 2012; Miyazaki et al., 2015; Kuritz et al., 1997; Ceballos-Laita et al., 2015; González et al., 2012; Nagata et al., 2007; Verma et al., 2014). Una de las cianobacterias capaces de degradar lindano es *Anabaena* (Kuritz, 1995). En presencia de nitrato, *Anabaena sp.* es capaz de degradar lindano desde una concentración de 0,5 µg/ml a 10 ng/ml en un tiempo de tres a cinco días, dependiendo de la densidad celular inicial. En ausencia de nitrato, el lindano se degrada mucho más lentamente (Kuritz, 1995). Vista la influencia de la disponibilidad de nitrato en la degradación de lindano, tanto en *Anabaena* como en *Nostoc elliosporum*, (Kuritz et al., 1997), se estudiaron los efectos de mutaciones en el operón *nir* (5- *nirA-nrtABCD-narB-3*), que codifica la nitrito y nitrato reductasa y proteínas de transporte de nitrógeno. Se analizó la capacidad degradativa de los mutantes *nirA*, *nrtC*, *nrtD* o *narB* y la cianobacteria no era capaz de producir la decoloración, incluso en presencia de nitrato. También influían en la capacidad de degradación la oscuridad y la presencia de NH₄⁺, inhibidores de las funciones del operón *nir*. Según esto, la nitrato reductasa sería una enzima esencial en la degradación del lindano y se especula que la decoloración de éste puede ser una función de un complejo de reducción nitrato-nitrito de la membrana. A pesar de la importancia de que *Anabaena* es una cianobacteria capaz de degradar lindano, las rutas implicadas en la degradación de lindano por esta cianobacteria son desconocidas.

3. Objetivos:

Este trabajo tiene como objetivo principal el estudio de la variación de la expresión génica en presencia de γ-lindano en la cianobacteria *Anabaena* PCC7120. En este contexto se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Tolerancia al γ-lindano de *Anabaena* PCC7120, midiendo para ello el crecimiento de la cianobacteria, contenido en clorofila *a* y el contenido de proteínas.
- Estudio de la expresión génica de genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo y metabolismo de nitrógeno en presencia de γ-lindano.
- Determinación de la expresión de genes potencialmente implicados en la degradación de lindano (*linB* y *linE*) en presencia del pesticida.
- Estudio comparativo en *Microcystis aeruginosa* PCC7806.
- Estudio de la tolerancia a γ-lindano de una cepa de *Anabaena* PCC7120 que sobreexpresa la proteína FurC.

4. Materiales y métodos:

4.1. Cepas y medios de cultivo utilizados:

La cepa de cianobacterias utilizada fue *Anabaena* PCC7120.

El cultivo se realizó en medio de cultivo BG11 esterilizado, con una composición de 1.35 g/L de NaNO₃, 0.738 g/L de NaHCO₃, 0.04 g/L de K₂HPO₄ x 3 H₂O, 0.036 g/L de CaCl₂ x 2 H₂O, 0.075 g/L de MgSO₄ x 7 H₂O y 0.02 g/L de Na₂CO₃, suplementado con 1 mL de suplemento. El suplemento compuesto por 6 g/L de citrato férreo amónico, 6 g/L de ácido cítrico, 1 g/L de EDTA, 2.86 g/L de H₃BO₃, 1.81 g/L de MnCl₂ x 4 H₂O, 0.138 g/L de ZnSO₄ x H₂O, 0.39 g/L de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0.079 g/L de CuSO₄ x 5 H₂O y 0.0494 g/L de CoCl₂, se preparó ensasando a 100 mL con H₂O destilada sin ajustar el pH, se esterilizó por filtración y se conservó a 4°C en oscuridad.

4.2. Estudio del efecto del γ-lindano:

4.2.1. Estudios de tolerancia a γ-lindano:

4.2.1.1. Cultivo en medio líquido- curvas de crecimiento:

Para llevar a cabo el seguimiento del crecimiento durante los 14 días de experimento se tomó 1 mL de cultivo, en condiciones estériles, de cada uno de los 5 cultivos y se midió su densidad óptica a 750 nm. Las medidas de absorbancia se tomaron por duplicado.

4.2.1.2. Estudios en placa:

Se llevó a cabo un estudio en placa de la tolerancia a γ-lindano en el que se comparó una cepa salvaje (*Anabaena* PCC7120), con una cepa que sobreexpresaba la proteína FurC.

Se tomaron diferentes cantidades de γ-lindano y se disolvieron en DMSO para obtener las distintas soluciones stock. De estas soluciones se tomó 1 μL y se añadió a 100 μL de los cultivos, obteniendo las siguientes concentraciones finales de lindano: 0.1 mg/L, 0.5 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 50 mg/L. También se añadió como control a uno de los cultivos, el mismo volumen de DMSO, para comprobar sus efectos en la supervivencia de la cianobacteria. El experimento se realizó por cuadruplicado y se incluyeron pocillos control en los que no se añadió ningún compuesto.

4.2.2. Cultivos para estudios de expresión génica:

Los experimentos con el pesticida se llevaron a cabo con células crecidas inicialmente en frascos de Roux de 1 L de capacidad en medio BG11 burbujeando con aire estéril, lo que permite una correcta aireación y agitación del cultivo. Este cultivo se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica en torno a 0.3.

Se prepararon 5 alícuotas de 100 mL que se trasvasaron a erlenmeyers de 250 mL con una densidad óptica de 0.15 cada una de ellas. Las 5 alícuotas de cultivo se distribuyeron de la siguiente forma: una condición control sin lindano, 3 alícuotas con 0.1 mg/L, 0.5mg/L y 5mg/L de lindano, y la última alícuota que contenía el mismo volumen de DMSO que las anteriores y no contenía lindano.

Para asegurarnos de cuál era la mejor concentración para los estudios posteriores tomamos medida de absorbancia, concentración de clorofila y proteína total.

Una vez determinada la concentración de γ -lindano que vamos a utilizar para el estudio de la expresión génica (5 mg/L), se prepararon 6 alícuotas de 100 mL cada una (3 condiciones diferentes por duplicado) y se trasvasaron a erlenmeyers de 250 mL con una densidad óptica de 0.31 cada una ellas. Las 6 alícuotas de cultivo se distribuyeron de la siguiente forma: 2 condiciones control sin lindano, 2 alícuotas con 5 mg/L de γ -lindano y las últimas dos correspondientes al DMSO.

A partir de estos cultivos se llevó a cabo el aislamiento de RNA total de *Anabaena* PCC7120 (materiales y métodos 3.4).

4.3. Métodos analíticos:

4.3.1. Determinación de proteína:

Este método se empleó para la determinación de la proteína total soluble existente en los extractos procedentes de cultivos de *Anabaena* PCC7120. Los extractos se obtuvieron a partir de células, de la forma siguiente:

- se centrifugaron 5 ml de células en tubos Falcon a 1700 g, 10 minutos y se retiró el sobrenadante.
- Se resuspendieron las células en Tris-HCl 50 Mm, pH= 8 10% glicerol.
- Se le añadió el inhibidor de proteasas PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
- Se rompieron las células por sonicación con 5 ciclos de 1 min descansando 45 seg entre ciclo y ciclo. Todo el proceso debe realizarse en baño de hielo.
- Se centrifugan las muestras 30 min a 17900 g.
- Se utilizó el sobrenadante para la determinación de proteínas ya que constituía el extracto crudo.

Con estos extractos se cuantificó la proteína total mediante el método del BCA, aplicando el protocolo de la casa comercial (ThermoFisher).

4.3.2. Determinación de clorofila:

Se determinó el contenido de clorofila *a* de los cultivos celulares espectrofotométricamente, según el procedimiento descrito por Mackinney (1941). A partir de 1 mL de cultivo, se centrifugó a 13000 g durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió en 1 mL de metanol, y tras 1 minuto de agitación, la suspensión se centrifugó a 17900 g durante 5 minutos. Todo el proceso se realizó en oscuridad, ya que la clorofila *a* puede degradarse en presencia de luz. La concentración de clorofila en el sobrenadante se determinó en función de su absorbancia a 665 nm, utilizándose como coeficiente de extinción molar ϵ de la clorofila *a* el valor de 74.46 (mg/ml) $^{-1}$ cm $^{-1}$.

4.4. Aislamiento de RNA total de *Anabaena* PCC7120:

4.4.1. Toma de muestras para RNA de *Anabaena* PCC7120:

Se deben llevar a cabo una serie de precauciones en el trabajo con RNA para evitar la presencia de RNAsas. Todo el proceso se llevó a cabo con agua DEPC, todo el material utilizado debe estar previamente autoclavado, utilización de puntas con filtro y limpieza de campana y material con NaOH 0,4N.

- Se recogieron 25 ml de cultivo en la fase de crecimiento deseada por centrifugación 10 minutos, 1700 g y 4°C.
- Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en lo que queda de medio. Se pasó a un eppendorf de 2 ml libre de RNAsas.
- Se centrifugó 5 minutos, 15300 g y 4°C. Se eliminó el sobrenadante.
- Se añadió al pellet 600 µl de Tris-HCl 50 mM/100 mM EDTA/ pH 8 y 130 µl de cloroformo.
- Se invirtió el tubo 4 veces para mezclar el buffer con las células.
- Se incubó 3 minutos en hielo y se centrifugó 5 minutos a 17900 g y 4°C. Se obtuvieron 3 fases: Superior: acuosa, Intermedia: células, Inferior: cloroformo.
- Se eliminó la fase superior acuosa y se desechó la punta de la pipeta. Se atravesó la interfase con una punta de la pipeta nueva y se eliminó la fase orgánica inferior.
- Se introdujo el eppendorf con la interfase (células) en nitrógeno líquido y se guardó a -80 °C hasta su uso. La caja en la que se guardan las muestras debe estar preenfriada.

4.4.2. Extracción de RNA:

- Se preparó el material y la zona de trabajo con las precauciones nombradas en el apartado 3.4.1.
- A la muestra de células obtenida de 25 ml de cultivo, se le añadieron: 300 µl de buffer de resuspensión (Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM, pH8), 100 µl de disolución 250 mM EDTA disódico pH 8, 400 µl de buffer de lisis (2% SDS, 10 mM Acetato Na, pH4,5), 1000 µl de fenol ácido a 65 °C.
- Se agitó en el vórtex durante 30 segundos. Se incubó 2,5 minutos a 65°C. Este proceso se repitió dos veces más. Se centrifugó 5 minutos a 17900 g. Se transfirió la fase acuosa (superior) a un eppendorf nuevo.
- Se añadió 1 ml de trizol, se agitó en vortex durante 30 segundos y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Se añadieron 200 µl de cloroformo, se agitó en vortex durante 30 segundos y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- Se centrifugó 5 minutos a 17900 g y se transfirió la fase acuosa a otro tubo eppendorf.
- Se añadió 1 volumen de cloroformo y se agitó en vórtex durante 30 segundos. Se centrifugó 5 minutos a 17900 g y se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo. Se repitió este paso.
- Se añadieron sobre la fase acuosa 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se agitó en el vortex y se dejó a -80°C durante 12 horas.
- Se centrifugó 30 minutos a velocidad máxima y 4°C.
- Se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet con de 500 µl de etanol al 70% frío. Se centrifugó 5 minutos a v máx y 4°C. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar.
- Se resuspendió el pellet en 90 µl de agua-DEPC. Se añadieron 10 µl de buffer de DNasa y 2 µl de DNAsal libre de RNAsas. Se incubó durante 70 minutos a 37°C y seguidamente a 65°C 10 minutos.

- Se cuantificó utilizando un NanoDrop, que realiza una medida espectrofotométrica de la muestra sabiendo que el máximo de absorción del RNA es a 260 nm. Por lo que midiendo su A₂₆₀ y comparándola con las referencias establecidas para una concentración conocida se puede deducir su concentración.
- El RNA obtenido se guardó a -80°C hasta su uso.

4.4.3. Electroforesis del RNA:

Tras la extracción del RNA, antes de continuar con el tratamiento de las muestras, es aconsejable analizar las muestras con una electroforesis en gel de agarosa al 1%, visualizado con bromuro de etidio 0.5 µg/ml, para comprobar de la integridad de RNA.

Para la preparación del gel, se disolvieron 0,5 g de agarosa en 50 mL de TBE (1x). Se cargaron 3 µl de RNA mezclados con 3 µl de tampón de carga (6x DNA loadingDye, azul de bromofenol y xileno cianol FF "ThermoScientific"). En uno de los pocillos se añadió el marcador de peso molecular φX174 DNA-HaeII.

Las condiciones de la electroforesis fueron 90 V de voltaje utilizando una fuente BioRad PowerPac300. Los resultados se visualizaron con un equipo GelDoc 200 (BioRad) y el programa MultiAnalist 1.1 (BioRad Laboratorios,1997).

4.4.4. Comprobación de la pureza del RNA aislado:

Un problema muy frecuente es que el RNA aislado esté contaminado con DNA, aunque haya sido tratado con DNase para evitarlo. Por lo tanto, debe comprobarse que el RNA carece de trazas de DNA porque si no, en la RT-PCR estaremos amplificando el gen del DNA y el resultado estará falseado.

Puede comprobarse la pureza del RNA mediante una PCR o bien directamente sobre la Real Time PCR, en mi caso se llevó a cabo una Real Time PCR con las muestras de RNA antes de hacer la retrotranscripción. Se preparó una dilución con 3µl de RNA +250 µl de H₂O. Se preparó el Mix del gen housekeeping *rpnB* para lo cual se tomaron 625 µl de SyBr, 10 µl de primer Forward *rpnB*, 10 µl de primer reverse *rpnB* y 355 µl de H₂O DEPC. Para cargar en la placa se tomaron 20 µl de mix y 10 µl de dilución.

4.4.5. Retrotranscripción:

La retrotranscripción es un proceso por el cual se obtiene cDNA total (ssDNA) complementario al RNA total aislado. Para llevar a cabo la retrotranscripción se utilizaron Random primers.

La mezcla de reacción se componía de 1 µl de random primers (300 ng/ µl), 2 µl de tampón de hidridación 10X, 1,5 µg de RNA y completar el volumen hasta 20 µl con H₂O DEPC.

- Las condiciones utilizadas fueron:
 - 10 minutos a 85°C (desnaturalizar la muestra)
 - 1 hora a 50°C (hibridación de los primers)
- Se inició la PCR y se preparó la alarma para que suene 10 minutos antes del final.
- Se añadieron 18 µl de la mezcla compuesta por 2 µl de mezcla de dNTPs 10 mM, 4 µl DTT 0,1 M, 8 µl de tampón 5X y 4 µl de H₂O.
- Se añadió a cada muestra 1 µl de SuperScript Retrotranscriptasa.
- Se introdujeron los tubos en el termociclador y se continuó con el programa de PCR.
- Una vez acabado el programa, se colocaron los tubos en una gradilla y se guardaron a 4°C.

Las muestras resultantes contienen 40 µl de cDNA total en cada uno de los tubos.

4.4.6. Estudio de la amplificación de fragmentos de genes de interés:

Para llevar a cabo la Real Time PCR fue necesario preparar un mix específico para cada gen de estudio. En la placa, deben añadirse 10 µl de mix y 5 µl de cDNA, que previamente hemos diluido 1/50, a cada uno de los pocillos sobre los que se va a realizar la Real Time PCR.

Se precisaba además de una recta patrón de cada uno de los genes utilizados, para asegurarnos de que la dilución utilizada es la correcta. Para ello se tomó el volumen de 7 µl del mix preparado para cada gen y se le añadieron 5 µl de las diluciones 1/10, 1/50, 1/250, 1/1250, H₂O DEPC, de cDNA.

Mediante Real Time PCR se cuantifica la expresión de un retrotranscrito de un gen diana en diferentes condiciones. La variación en la expresión génica se recogió mediante el programa “QuantStudio Real-Time PCR Software” de la casa comercial ThermoFisher. Dicho programa recoge un valor de CT determinado, que mediante una serie de cálculos determinará el cambio producido en la expresión de los genes de estudio. Cálculos realizados:

1. Se calculó la media de las réplicas técnicas, para obtener un solo valor de estas.
2. Se calculó el $\Delta Ct = (Ct \text{ salvaje} - Ct \text{ housekeeping})$
3. Se calculó el $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra (lindano o DMSO)} - \Delta Ct \text{ muestra control}$
4. Se obtuvo la variación de la expresión del gen, expresado como Foldchange y calculado a partir de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. En el caso de que el valor obtenido sea menor que 1 se deberá calcular el inverso y cambiarlo de signo.

Los genes de *Anabaena* cuya expresión fue cuantificada en este estudio fueron: *linB*, *linE*, *furA*, *furB*, *furC*, *prxA*, *ntcA*, *nirA*.

Se llevó a cabo el mismo método de cuantificación para la expresión de los genes de *Microcystis aeruginosa*: *linB*, *linE*, *prxA*, *nirA*.

Para esta cuantificación se partió de muestras de cDNA de *Microcystis* extraídas previamente por la licenciada Laura Ceballos para la realización de su memoria. Las muestras se cultivaron 3 y 6 días en presencia de γ-lindano. Se llevó a cabo su conveniente extracción y tratamiento hasta la obtención de cDNA, que se congeló a -80 hasta su utilización. El programa que se utilizó para llevar a cabo la Real Time PCR está representado en la **tabla 1**.

Tabla 1. programa mediante el que se llevó a cabo la Real Time PCR.

		40 ciclos				Curva de Melting		
Temperatura (°C)	50	95	95	60	95	60	95	
Tiempo	2 min	10 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	

4.5. Estudios “in silico”:

Se llevaron a cabo estudios “in silico” para los que se utilizaron bases de datos como “Cyanobase” utilizada para obtener secuencias proteicas y génicas y para consultar contextos génicos de los genes de estudio. “Blast” para buscar homologías entre secuencias. “ClustalW” para hacer alineamientos y “phylogeny” para la creación de los distintos arboles filogenéticos.

5. Resultados:

5.1. Tolerancia al γ -lindano de *Anabaena* PCC7120:

En primer lugar, se planteó establecer la tolerancia al γ -lindano de *Anabaena* PCC7120 en las condiciones de trabajo. Esta información es interesante en sí misma, y además permitió determinar las concentraciones de lindano para estudios de expresión génica. Para ello se partió de cultivos a los que se les añadieron diferentes concentraciones de lindano (Materiales y métodos 4.2.1.) y se llevó a cabo un seguimiento de los mismos durante 14 días estudiando parámetros de absorbancia, concentración de clorofila y concentración de proteína total. Se tomaron medidas a tiempo 0, 24, 48 h, 5, 7, 9, 11 y 14 días. Las concentraciones de γ -lindano utilizadas fueron 0.1, 0.5 y 5 mg/L y se escogieron en base a un trabajo previo con otra cianobacteria (Ceballos et al, 2015).

5.1.1. Curvas de crecimiento a distintas concentraciones de γ -lindano:

Para determinar el crecimiento de *Anabaena* PCC7120 se midió la absorbancia a 750 nm de los cinco cultivos a los tiempos especificados anteriormente.

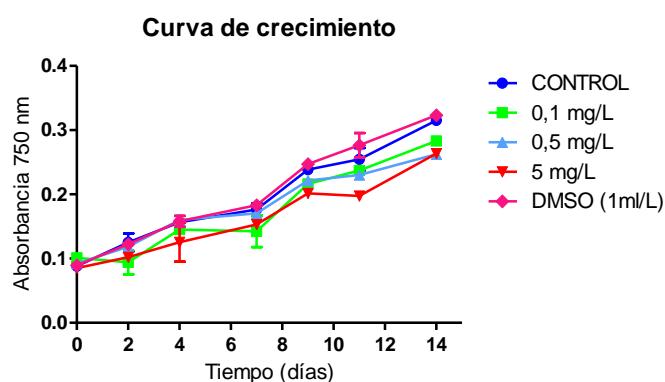


Figura 1. Curva crecimiento de *Anabaena* PCC7120 en presencia de distintas concentraciones de γ -lindano.

La **figura 1** muestra un aumento en la absorbancia de todos los cultivos, lo que podría traducirse en un aumento en el número de cianobacterias en todos ellos, viéndose levemente afectados los cultivos que presentan γ -lindano, aunque la afectación no es muy grave y ninguna de las concentraciones sería letal. El DMSO tampoco está afectando al crecimiento de las cianobacterias.

5.1.2. Efecto de la concentración de γ -lindano sobre el contenido en clorofila *a* y el contenido de proteínas:

La determinación de clorofila se realizó mediante la cuantificación del contenido de clorofila *a* de los cultivos, tal y como se explica en el apartado 4.2.3. de Materiales y métodos. Se tomaron medidas a los tiempos ya especificados. En la **figura 2A** se observa que a diferencia de lo que ocurría en la **figura 1** con la absorbancia, la cantidad de clorofila sí se ve afectada por el γ -lindano. Esta variación comienza a apreciarse a los 7 días y la diferencia entre la muestra control y tratada con DMSO y las tratadas con γ -lindano se agrava cada vez más con el aumento del tiempo. A tiempo 14 días podemos observar una gran diferencia de concentración de clorofila, siendo las muestras más afectadas las de

concentración 0,1 mg/L y 0,5 mg/L de γ -lindano. Sorprendentemente la muestra con 5 mg/L no presenta tanta disminución en la cantidad de clorofila como podría esperarse al observar lo ocurrido en las muestras con menor concentración de γ -lindano. La muestra con DMSO presenta cierto cambio, pero no parece afectar demasiado en comparación con las muestras tratadas con el pesticida.

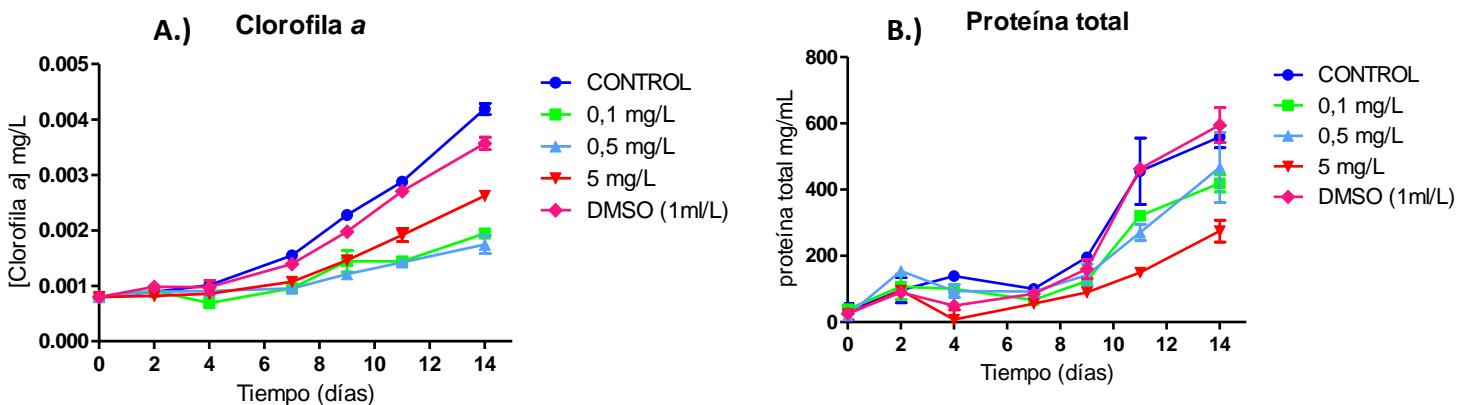


Figura 2. A. Concentración de clorofila; **B.** Concentración de proteína total, ambas en presencia de distintas concentraciones de γ -lindano

La determinación de proteína se realizó mediante el método BCA, tal y como se explica en el apartado 4.2.4. de materiales y métodos. Se tomaron medidas a tiempos ya detallados. En la **figura 2 B** se recogen las diferencias mostradas por los cultivos en relación a cambios en la proteína total de los diferentes cultivos. Se observan cambios significativos a partir de los 11 días. No se observaron cambios en la muestra con DMSO con respecto a la muestra control, pero sí lo hicieron las muestras tratadas con γ -lindano siendo la más afectada la que presenta una mayor concentración de éste.

5.2. Estudio de la expresión génica mediante PCR a Tiempo Real:

Para el estudio de la expresión génica se eligió la concentración de 5 mg/L, puesto que el objetivo era ver cambios en la expresión génica a tiempos cortos (24/48 horas).

5.2.1. Expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo en presencia de γ -lindano:

Los genes de respuesta a estrés oxidativo que formaron parte del estudio fueron: *furA*, *furB*, *furC* y *prxA*. La familia de genes Fur está implicada en la respuesta a estrés oxidativo de *Anabaena PCC7120*, además alguno de sus miembros como FurB puede unirse al DNA y protegerlo frente a dicho estrés (López-Gomollón et al., 2009). También se estudió la expresión de *prxA* ya que esta proteína es una proteína clave en la respuesta a estrés oxidativo y su expresión está claramente inducida cuando la cianobacteria está sometida a este tipo de estrés. Todos los datos que se presentan a continuación van a ser considerados representativos o no, en función de si superan el umbral 1.5/-1.5 y en relación a su comparación con la muestra que contiene DMSO, ya que fue el solvente utilizado.

En la **figura 3 A**, se muestra la expresión del gen *furA*, en la que se observaron unos valores negativos para la muestra recogida a 24 horas, afectando más a la expresión de la muestra de DMSO. En el caso de las muestras tomadas a 48 horas, los valores son positivos, y aunque el valor obtenido para la muestra de lindano es superior que el de DMSO, los cambios no pueden considerarse relevantes puesto que la diferencia entre ambos es mínima. En la **figura 3 B**, se muestran los cambios recogidos en la expresión del gen *furB*. Las muestras recogidas a 24 horas, el valor recogido en la muestra de DMSO es -1,9, mientras que el de la muestra con lindano es -1,61, el pequeño cambio que se observa podría ser debido a la incidencia del DMSO. En el caso de los valores recogidos a 48 horas obtenemos valores positivos, pero no relevantes debido a que no superan el umbral establecido anteriormente. Vistos ambos genes, observamos que presentan una tendencia de cambio similar las muestras que presentan lindano y las que presentan DMSO, lo cual nos lleva a pensar que, como se ha comentado con anterioridad, los cambios observados pueden ser debidos al efecto del DMSO y no al γ -lindano. La **figura 3 C**, muestra los cambios de expresión sufridos por el gen *furC*. En el caso de las muestras tomadas a 24 horas se observa un cambio mayor en DMSO que en la de lindano, por ello no aporta resultados representativos. En el caso de las muestras tomadas a 48 horas se observa un cambio notable en la muestra de γ -lindano obteniendo un valor de 2,7, mientras que el valor obtenido en la muestra de DMSO es únicamente de 1,44, por lo que el cambio observado corresponde a la incidencia de γ -lindano presente. En la **figura 3 D**, los valores de la expresión del gen *prxA* a las 24 horas no son representativos, puesto que aunque superan el umbral establecido, el valor obtenido para la muestra con DMSO es superior a la muestra con lindano (-2,4 y -1,44 respectivamente). En el caso de las muestras recogidas a las 48 horas el valor obtenido para lindano es de 1,56, mientras que en la muestra de DMSO se recoge el valor de -1,34, con lo que podemos confirmar un aumento en la expresión de este gen en la muestra con lindano a 48 horas. El hecho de que aumente la expresión de los genes *furC* y *prxA*, ambas relacionadas estrechamente con la respuesta a estrés oxidativo, indica que las células expuestas a lindano están sufriendo estrés oxidativo. Esta hipótesis será discutida más a fondo en la Discusión.

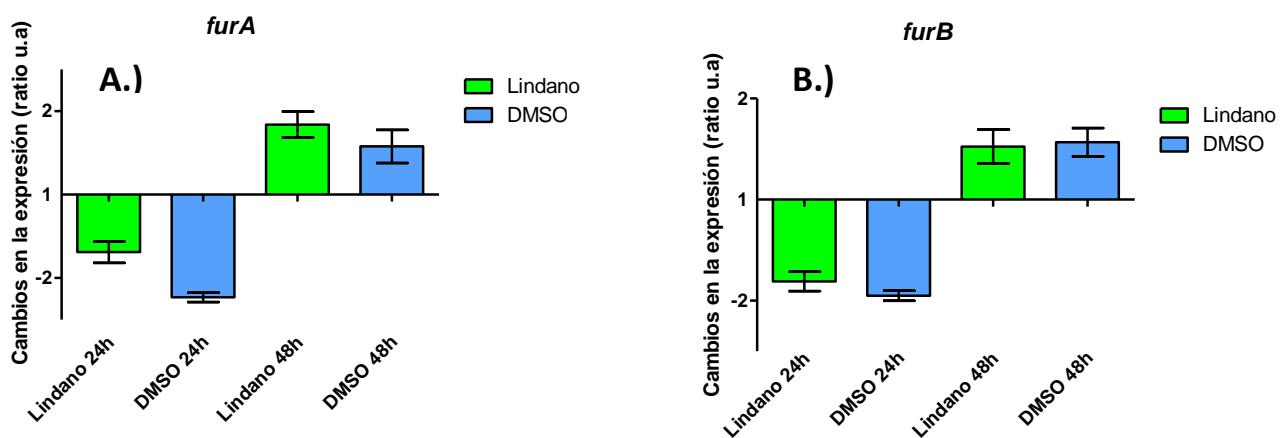


Figura 3. Paneles A y B. Cambios relativos en los niveles de transcripción de diferentes genes en *Anabaena* PCC7120 como consecuencia de exposición a 5 mg/L de γ -lindano A.): expresión del gen *furA*, B.): expresión del gen *furB*. Los datos se han referido al control sin el pesticida. Las barras de error representan la desviación estándar.

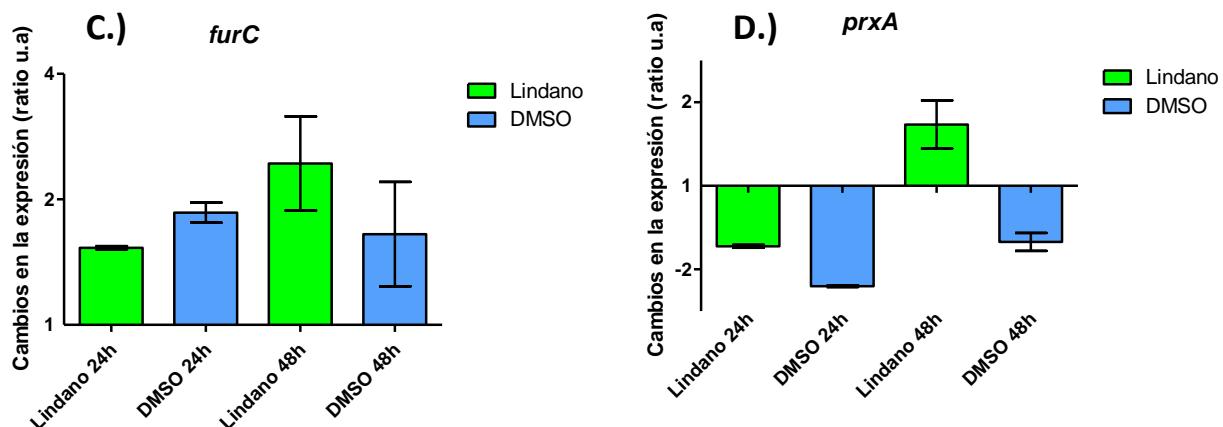


Figura 3. Paneles C y D. Cambios relativos en los niveles de transcripción de diferentes genes en *Anabaena* PCC7120 como consecuencia de exposición a 5 mg/L de γ-lindano. C: expresión del gen *furC* y D: expresión del gen *prxA*. Los datos se han referido al control sin el pesticida. Las barras de error representan la desviación estándar.

5.2.2. Estudio de expresión de genes potencialmente implicados en la degradación de γ-lindano:

5.2.2.1. Estudios bioinformáticos:

Estudios previos del grupo; indicaban que una proteína identificada como haloalcano deshalogensa se encontraba inducida en presencia de lindano (Smienk et al., resultados sin publicar). Sangwan et al., (2012) y Nagata et al., (2007) describen en *Sphingomonas paucimobilis* la presencia de un gen que denominan *linB*, y que corresponde con una haloalcano deshalogenasa que forma parte del operón *lin*, el cual está implicado en la degradación de lindano por parte de esta bacteria, como se ha indicado en la Introducción. Por esta razón se llevó a cabo un alineamiento entre la haloalcano deshalogensa (*alI0193*) de *Anabaena* y *linB* de *Sphingomonas* y los resultados del alineamiento indicaron que podría tratarse de un ortólogo de esta proteína. Los datos del alineamiento se encuentran reflejados en **Material suplementario 8.2.1**.

Anabaena era capaz de degradar lindano (Kuritz et al., 1997), pero los genes implicados en este proceso eran desconocidos. Por ello, se consideró oportuno estudiar la potencial presencia en *Anabaena* de genes homólogos a los de *Sphingomonas* que codifiquen para enzimas capaces de degradar lindano. En el caso de *linR* que es el regulador transcripcional de la ruta de degradación de lindano en *Sphingomonas*, se encontró homología con *alr0353* de *Anabaena* (**sección 8.2.2 de Material suplementario**). Para ello se llevó a cabo una búsqueda de secuencias homólogas de *linR* de *Sphingomonas* en el genoma de *Anabaena* utilizando BlastP. Gracias a lo cual se consiguió identificar el gen *alr0353* como un potencial gen *linR* en *Anabaena*. Al estudiar su contexto génico (**figura 9 Material suplementario**), se observó que al igual que el caso de *Sphingomonas*, había un potencial *linE*, codificando una carbonilo reductasa en el genoma de *Anabaena*. Dicha enzima corresponde con el gen *alI0352*, y los datos se encuentran reflejados en la sección **8.2.3 de Material suplementario**.

Por último, se llevó a cabo un estudio para comprobar si estaban conservados los genes *linB* y *linE* en cianobacterias. Para ello se utilizaron herramientas bioinformáticas, partiendo de la secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la cyanobase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>). Una vez se hubo obtenido la secuencia, se aplicó el programa Blast para obtener un listado de los organismos que presentan una proteína que podría corresponder con LinB y LinE en distintas cianobacterias. Se seleccionaron las 20 cianobacterias que presentan un 70 % de identidad o un valor mayor y se descargaron sus secuencias. Para representarlas sus relaciones evolutivas, se construyó un árbol filogenético mediante un alineamiento con ClustalW, que se compactó dicho alineamiento con Gblocks y finalmente se obtuvo el árbol filogenético representado en la figura 10 y 11 de material suplementario, correspondientes a LinB y LinE respectivamente. En la **figura 10 Material suplementario** se puede observar que la proteína LinB se encuentra conservada en muchas cianobacterias. En la figura se muestran 24 de ellas, presentando una mayor cercanía filogenética organismos como *Nodularia spumigenao* *Tolyphothrizsp.* PCC7110. Siendo ambas las que presentaban una identidad mayor. En la **figura 11 Material suplementario** se puede observar que la proteína LinE se encuentra conservada en un menor número de cianobacterias que en el caso de LinB, mostrándose únicamente 12 organismos. Los más cercanos filogenéticamente en el caso de LinE son *Microchaete sp.* PCC7126, *Calothrixsp.* PCC7507 y *Nostocsp.* PCC7107. No tratándose de las mismas cianobacterias que en el caso anterior. Por lo tanto, de estos estudios podemos concluir que la proteína LinE se encuentra menos conservada que LinB.

5.2.2.2. PCR a Tiempo Real de potenciales genes *linB* y *linE*:

Si estos genes estaban implicados en la degradación del lindano, existía la posibilidad de que se encontrasen sobreexpresados en presencia de lindano. Para estudiar los niveles de expresión de estos genes en las células tratadas con lindano, llevamos a cabo PCR a Tiempo Real. En la **figura 4 A**, se muestran los valores de cambio de expresión recogidos para *linB*. Todos los valores obtenidos para este gen son negativos. En el caso de las muestras recogidas a 6 horas y a 48 horas los valores obtenidos en el caso de la muestra de lindano y DMSO son muy similares, por lo tanto, el cambio observado parece ser debido al DMSO. En el caso de la muestra recogida a 24 horas, el valor obtenido para la muestra de γ-lindano es de -2,11, mientras que la de DMSO es de -1,33 así pues se observa una disminución en la expresión de *linB* en presencia de lindano a 24 horas. En la **figura 4 B**, se muestra la expresión de *linE*. Las muestras recogidas a las 24 horas presentan unos valores de disminución de la expresión que superan el umbral establecido, siendo estos -4,96 en la muestra de lindano y -2,12 en la muestra de DMSO. Por lo tanto, se observa una disminución en la expresión de *linE* a 24 horas. En el caso de las muestras tomadas a 48 horas, la disminución de la expresión es todavía mayor, recogiendo los valores de -7,17 para la muestra de lindano y -2,48 para la muestra DMSO. Como podemos observar el valor de DMSO en ambos tiempos se mantiene prácticamente constante. Por lo tanto, a diferencia de lo que puede pensarse a priori, los genes *linB* y *linE* no están sobreexpresados en la cianobacteria *Anabaena* PCC7120 en las condiciones experimentales llevadas a cabo en este estudio.

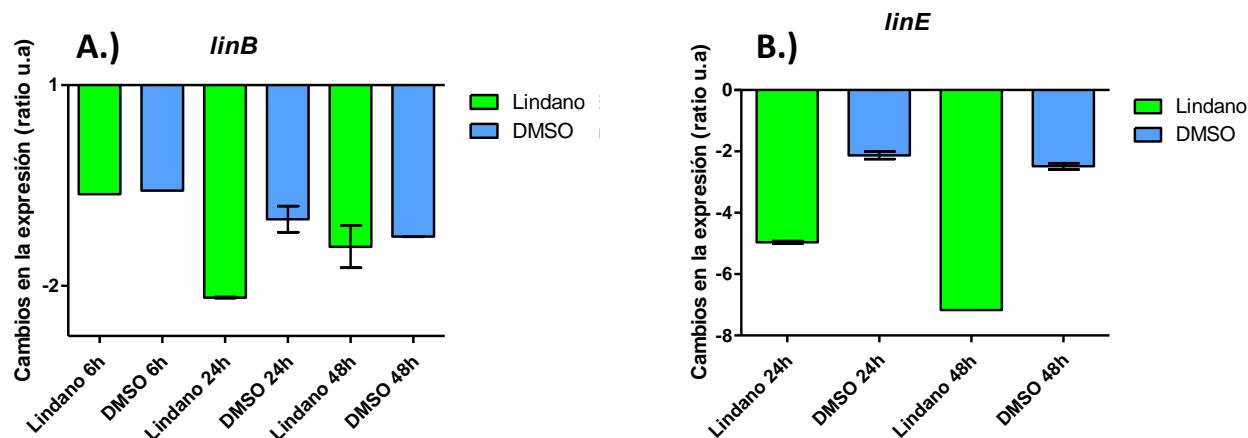


Figura 4. Cambios relativos en los niveles de transcripción de diferentes genes en *Anabaena* PCC7120 como consecuencia de exposición a 5 mg/L de γ-lindano. A: expresión del gen *linB*, B: expresión del gen *linE*. Los datos se han referido al control sin el pesticida. Las barras de error representan la desviación estándar.

5.2.3. Estudio de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de nitrógeno como respuesta a la presencia de γ-lindano:

Como se ha comentado en la Introducción, en estudios previos se ha observado que el gen *nirA* que codifica nitrito reductasa es imprescindible para que se lleve a cabo eficazmente la degradación de lindano (Kuritz et al., 1997). En el caso de *ntcA*, es el regulador global del metabolismo del nitrógeno e implicado por tanto en regular *nirA*. Es por eso que se ha considerado interesante que ambos genes formen parte del estudio. Además, en el caso de *nirA* se había visto un importante aumento de su expresión en presencia de lindano en *Microcystis aeruginosa* (Ceballos-Laita et al., 2015). En la **figura 5 A**, se observa una disminución en la expresión del gen *nirA*. Las muestras recogidas a 24 horas presentan valores negativos, siendo -1,24 para la muestra de lindano y -1,69 en el caso de DMSO. Como se observa una mayor disminución en el caso de la muestra que presenta DMSO, podemos deducir que la disminución observada en la muestra de lindano es debida al solvente. Las muestras recogidas a 48 horas también presentan una disminución, pero en este caso ocurre lo contrario. El valor obtenido para la muestra de lindano es de -2,26, mientras que en el caso del DMSO es de -1,5. Así pues, podemos observar una disminución de la expresión debida al lindano a las 48 horas. En la **figura 5 B**, se muestran los datos recogidos en la expresión de *ntcA*, sin ser relevantes, puesto que en el caso de las muestras recogidas a 24 horas el valor de la muestra de lindano y DMSO es muy similar, siendo estos valores -2,02 y -1,89 respectivamente. Por lo que el ligero cambio que se observa es debido al DMSO. En el caso de los resultados obtenidos a 48 horas, para la muestra de lindano obtuvimos un valor de -1.31, mientras que para DMSO fue 1.09. Por lo que se ha considerado que ninguno de los dos resultados resulta representativo.

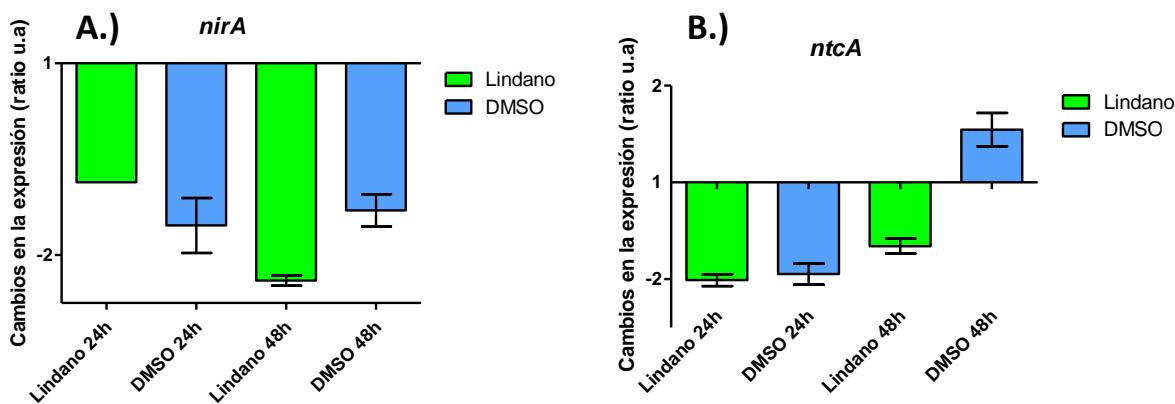


Figura 5. Cambios relativos en los niveles de transcripción de diferentes genes en *Anabaena* PCC7120 como consecuencia de exposición a 5 mg/L de γ -lindano. A: expresión del gen *nirA*. B: expresión del gen *ntcA*. Las barras de error representan la desviación estándar.

5.3. Estudio de la expresión de genes en *Microcystis aeruginosa* como respuesta a la presencia de γ -lindano:

Tras los estudios en *Anabaena*, se decidió llevar a cabo el estudio de la expresión génica en otra cianobacteria (*Microcystis aeruginosa* PCC7806), para comprobar la respuesta de estos genes al lindano. En esta cepa ya se había comprobado que en presencia de lindano aumentaba la expresión de *nirA* (Ceballos-Laita et al., 2015), así que dicho gen se introdujo de nuevo en el estudio como control. También se estudiaron potenciales *linB* y *linE*, identificados en el genoma de *M.aeruginosa* (datos no mostrados), puesto que ambos genes son importantes en la ruta de degradación de lindano. Además de ellos se estudió también el gen *prxA* debido a su importancia en la respuesta frente a estrés oxidativo. Aunque únicamente en el caso de *linE* y *prxA* fue posible amplificarlos con los cebadores utilizados, como muestra la **figura 6**.

Para el diseño de los cebadores utilizamos el programa PrimerExpress 3.3 de AppliedBiosystems, pero en el caso de *linB* el programa no generó cebadores apropiados. Aun así, se diseñaron unos cebadores manualmente y se llevó a cabo PCR a Tiempo Real sin obtener resultados.

En el estudio de *linE* para *Microcystis* se observa un aumento de la expresión a tiempo 3 días y a 6 días (**figura 6 A**). El valor obtenido a tiempo 3 días fue de 2,66, mientras que a tiempo 6 días fue de 1,61. Aunque la expresión del gen disminuya a los 6 días, podemos afirmar que la presencia de lindano aumenta la expresión de éste. El hecho de que disminuya a lo largo del tiempo puede ser debido a que a los 6 días comienza a declinar la respuesta transcripcional. Para el gen *prxA* se observa aumento de la expresión del gen (**figura 6 B**), aunque no es un aumento tan notable como en el caso de *linE*. El valor recogido a tiempo 3 días es de 1,93, mientras que a tiempo 6 días es de 1,22. Como se ha explicado en el caso de la figura 6 A, la disminución de la expresión a tiempo 6 días en relación a tiempo 3 días podría ser debida a que la respuesta transcripcional a ese tiempo ya ha declinado.

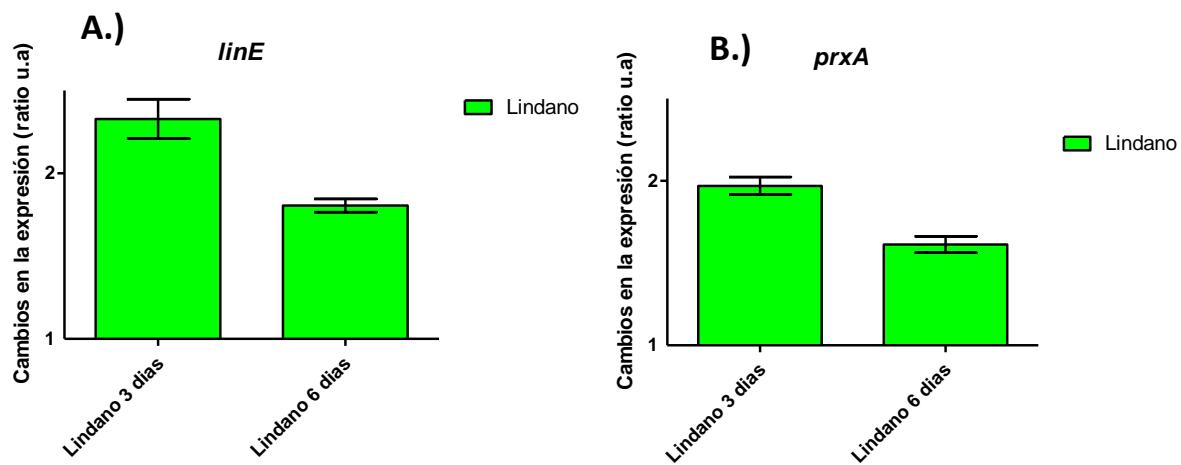


Figura 6. Cambios relativos en los niveles de transcripción de genes determinados en *Microcystis aeruginosa* como consecuencia de exposición a 7 mg/L de γ-lindano. A: expresión del gen *linE*. B: expresión del gen *prxA*. Los datos se han referido al control sin el pesticida. Las barras de error representan la desviación estándar.

5.4. Estudio de la tolerancia al estrés oxidativo producido por γ-lindano de una cepa de *Anabaena* PCC7120 que sobreexpresa FurC:

Dados los resultados anteriores, y el interés del grupo en la familia de reguladores Fur, se consideró de interés estudiar el efecto de γ-lindano sobre una cepa con sobreexpresión de FurC. La cepa que sobreexpresa FurC muestra tolerancia mayor al lindano en todos los casos con un aumento de supervivencia en torno al 15%. Destacamos entre todos los datos la concentración de 10 mg/L con un 67.40% para la cepa salvaje y 87,23% para la cepa de sobreexpresión y el caso de la muestra de 0.1 mg/L con una tolerancia del 84,77% en la cepa salvaje mientras que en la cepa de sobreexpresión se observa un 96,65%.

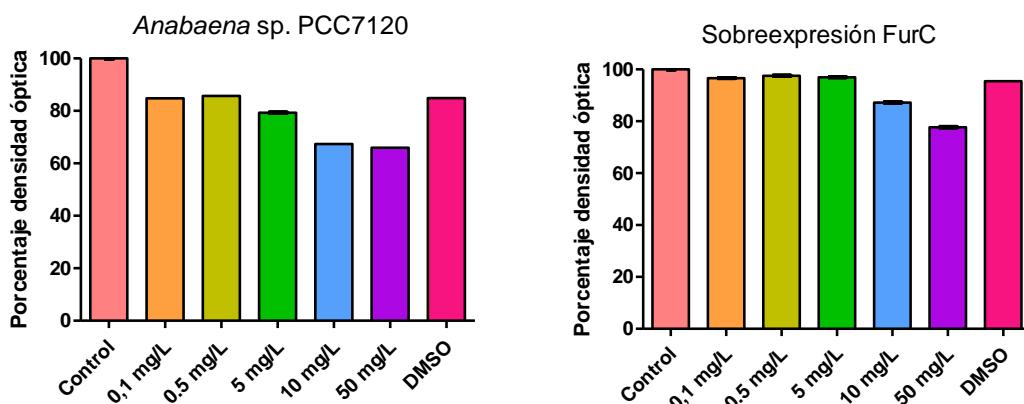


Figura 7. Representación tolerancia a diferentes concentraciones de γ-lindano y DMSO por la cepa salvaje (gráfico A), y otra con sobreexpresión de FurC (gráfico B). Ambas están expresadas en porcentajes correspondiendo a un porcentaje del 100 % de la muestra control (sin tratar). Las barras de error representan la desviación estándar.

6. Discusión:

6.1. Tolerancia de *Anabaena* PCC7120 a γ-lindano:

Estudios previos a este trabajo habían demostrado que la cianobacteria *Anabaena* PCC7120 era capaz de degradar el isómero γ del lindano (Kuritz et al., 1997). Con este hecho de partida, el objetivo de este trabajo fue identificar genes de respuesta al pesticida, con una finalidad a largo plazo que era el diseño de biosensores. En principio, se consideró importante para los experimentos de transcriptómica, determinar una concentración de lindano suficientemente alta para generar la respuesta en *Anabaena* que no afectase gravemente a la cianobacteria. Con este fin se determinaron tres parámetros que dan una idea del estado fisiológico de *Anabaena*. Estos parámetros fueron el crecimiento, la cantidad de clorofila *a* y la proteína total. En los resultados se observa que la presencia de distintas concentraciones de lindano disminuye ligeramente el crecimiento de los cultivos. Además, se muestra que el efecto no se debe al DMSO porque el cultivo tratado con DMSO, presenta un crecimiento análogo al cultivo control. Sin embargo, la absorbancia a 750 nm, aunque es una medida de crecimiento usualmente empleada, a veces lleva a equívocos debido a la turbidez que se genera en presencia de determinados compuestos, provocando un falso aumento en la absorbancia. Esto es lo que parece que estaba sucediendo en nuestro caso ya que en la medida de clorofila *a* y proteína total se observan diferencias notables entre las muestras tratadas con lindano y la muestra control o tratada con DMSO.

Los datos de clorofila *a* y de proteína total permiten decir que *Anabaena* PCC7120 tolera concentraciones altas de γ-lindano en las fases iniciales de crecimiento y que la presencia de DMSO no parece afectar al crecimiento en dichas fases iniciales. Sin embargo, a partir del día 7 en el caso de la clorofila y 11 en el caso de la proteína total, las células empiezan a estar más afectadas en presencia de lindano, ya que se ven disminuidas tanto la concentración de clorofila como la de proteína total con respecto a la muestra control y la que contiene DMSO. La tolerancia a concentraciones altas de lindano de *Anabaena* es superior a las descritas para otras cianobacterias, con la excepción de *Microcystis* (Ceballos-Laita et al., 2015)

Por todo esto se decidió utilizar para los estudios de expresión génica una concentración de 5 mg/L de lindano, puesto que los datos indicaban que aunque la concentración fuese elevada, a tiempos cortos las cianobacterias no se veían afectadas en exceso por la presencia de este pesticida.

6.2. Expresión génica:

A pesar de que la contaminación por lindano es un problema muy importante y que la biorremediación con microorganismos puede ayudar a paliar el problema, realmente se han llevado a cabo muy pocos estudios para obtener los cambios fisiológicos que se desencadenan en microorganismos degradadores de lindano se ponen en contacto con él. Hace algunos años se publicó en un análisis metagenómico en el que se ha estudiado el

aumento de la expresión de los genes de la ruta de degradación de lindano en diferentes organismos (Sangwan et al., 2012).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar en cianobacterias la respuesta al lindano y analizar los genes que se expresan en presencia del pesticida.

6.2.1. Efecto del DMSO y estrés oxidativo:

Cuando se comenzó el trabajo aparecieron dudas sobre qué solvente utilizar, por la baja solubilidad del lindano y porque estudios previos indicaban que el etanol afectaba a la viabilidad de *Anabaena* (González et al., 2012; Bueno et al., 2004).

Se decidió utilizar DMSO debido a que es un solvente orgánico comúnmente utilizado en este tipo de estudios, por ejemplo para disolver hidrocarburos con baja solubilidad como los alcanos (Kumari et al., 2011; Sevilla et al., 2015). Los estudios de expresión génica permiten en general llegar a la conclusión de que el DMSO en proporción 1mL/L, afecta a la expresión génica. Este aspecto no se esperaba al inicio de este trabajo, pues trabajos previos indicaban que este solvente no afectaba. A pesar de este imprevisto y a la vista de los resultados, puede concluirse que la expresión de *furC* y *prxA* está inducida en presencia de lindano. Ambos genes responden a estrés oxidativo y su expresión desencadena mecanismos de defensa a estrés oxidativo. Esta relación entre la presencia de lindano y el estrés oxidativo no se había observado previamente. La proteína PrxA pertenece a la familia de la peroxiredoxinas, éstas son peroxidases tiol-específicas que catalizan la reducción de H₂O₂, alquilhidroperoxidos y peroxinitritos usando tiorredoxina y otro tiol que contiene agentes reductores como donores de electrones (Boileau et al., 2011). En presencia de lindano aumenta su expresión génica a 48 horas. En el caso de *furC*, se sabe que su expresión aumenta en presencia de agua oxigenada (López-Gomollón et al., 2009). Su expresión en presencia de lindano también se ve aumentada a 48 horas.

6.2.2. Genes *lin*:

Las rutas de degradación de lindano están perfectamente definidas en *Sphingomonas*, por el contrario, en *Anabaena* se desconocen. El género *Anabaena* y concretamente *Anabaena PCC7120* ha sido descrita como capaz de degradar lindano (Kuritz et al., 1997). Sin embargo, no se ha descrito la ruta metabólica implicada en su degradación. El estudio bioinformático permitió hipotetizar que tal vez lo hacía a través de una secuencia de reacciones análogas a las descritas para *Sphingomonas paucimobilis* (Endo et al., 2005; Sangwan et al., 2012; Nagata et al., 2007) y con una batería de genes análogos al operon *lin* (Nagata et al., 2007; Sangwan et al., 2012). El estudio bioinformatico permitió identificar potenciales homólogos y se procedió a su estudio. Sin embargo, los resultados obtenidos han indicado que estos genes no se encuentran inducidos en presencia de γ-lindano, al menos en las primeras 48 horas. En el caso de *Sphingomonas paucimobilis* el gen *linB* se expresa de manera constitutiva, mientras que *linE* es un gen inducible que presenta un activador (*linR*) que inducirá la expresión en presencia de intermediarios de la ruta de degradación de lindano. Aunque este hecho podría no cumplirse para *Anabaena* puesto que se trata de un organismo diferente. En estudios posteriores sería interesante prolongar el estudio al menos hasta 6-8 días y cambiar el solvente ya que este puede estar

falseando los resultados. Por otro lado, merece la pena mencionar que habría sido interesante encontrar un aumento en la expresión génica en uno o ambos genes, por su gran interés a la hora de diseñar un biosensor. Se pueden diseñar biosensores de células completas basándose en una construcción genética que contiene una fusión transcripcional del promotor de interés a una proteína reporter (van der Meer et al., 2010). Estos biosensores son interesantes en el monitoreo medioambiental y serían muy útiles para monitorizar las zonas contaminadas con lindano como es el caso del río Gállego y de los vertederos de Bailín y Sardas.

6.2.3. Genes del metabolismo del nitrógeno:

Aunque no se conozca la ruta de degradación de lindano en *Anabaena*, se sabe que su degradación está muy relacionada con el metabolismo del nitrógeno (Kuritz et al., 1997). En este estudio los genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno han demostrado una regulación negativa como consecuencia de la presencia de γ-lindano. En el estudio de los genes de *Anabaena* se observa una disminución en la expresión, al contrario de lo que se había observado previamente para *Microcystis* (Ceballos-Laita et al., 2015), donde la expresión de *nirA* aumentaba en presencia de lindano. Las posibles causas en la diferencia de expresión entre ambos son variadas, incluyendo entre ellas que *Anabaena* es fijadora de nitrógeno y *Microcystis* en cambio no lo es, así pues, el metabolismo del nitrógeno puede estar regulado de forma distinta. Otra posible causa es el tiempo de estudio, siendo para *Anabaena* 24 y 48 horas, y para *Microcystis* de 3 y 6 días. Además, el lindano y DMSO presentes en la muestra pueden resultar un estrés excesivo para la cianobacteria las primeras horas, pudiendo modificar su metabolismo en tiempos más largos y comenzando la transcripción de genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno para llevar a cabo la degradación del pesticida.

6.2.4. *Microcystis aeruginosa*:

En *Microcystis aeruginosa* se había estudiado previamente la capacidad de degradar lindano (Ceballos-Laita et al., 2015), coincidiendo la reducción de la concentración del pesticida con el aumento de la expresión de genes que responden a estrés oxidativo como *furA*, y genes implicados en el metabolismo del nitrógeno como *nirA* o *ntcA* (Ceballos-Laita et al., 2015). El estudio genético llevado a cabo en el presente trabajo en *Microcystis aeruginosa* ha resultado positivo, aumentando la expresión de ambos genes de los que se han obtenido resultados (*linE* y *prxA*). En *Sphingomonas paucimobilis* *linE* se encuentra situado formando un operón con *linD* y ambos genes son regulados por *linR*. Por lo tanto, *linE* se expresará cuando haya presencia de intermediarios de la ruta de degradación de lindano (Nagata et al., 2007). El aumento de expresión del gen *linE* observado en este presente trabajo sugiere que la proteína LinE propuesta podría formar parte de la ruta que utiliza *Microcystis* para degradar lindano.

En el caso del gen *prxA*, como ya se ha comentado con anterioridad es un gen que responde a estrés oxidativo. Es destacable el hecho de que el gen *prxA* aumente su expresión en ambos organismos de estudio, lo cual nos confirma que el lindano produce estrés oxidativo tanto en *Microcystis aeruginosa* como en *Anabaena*. En el caso de *linE* los resultados obtenidos al comparar ambos organismos son contrarios, teniendo una respuesta positiva en *Microcystis* y negativa para *Anabaena*, podría ser debido a la

presencia del DMSO o porque en el caso de *Anabaena linE* no fuera inducible, mientras en *Microcystis* si lo sea.

6.3. Efecto protector de FurC

La proteína FurC ve aumentada su expresión en presencia de agentes que generan estrés oxidativo (López-Gomollón et al., 2009). La alta respuesta de este gen frente a estrés oxidativo ha llevado a proponerlo como el regulador PerR, aunque la imposibilidad de obtener un mutante dificulta enormemente la demostración de este hecho (Yingping et al., 2014).

La cepa que sobreexpresaba FurC mostró una tolerancia mayor a γ-lindano, obteniendo una tolerancia de aproximadamente el 90% en todas las concentraciones (exceptuando 50 mg/L) una cantidad extraordinariamente alta. En el estudio de la expresión génica también se ha observado un aumento en la expresión de *furC* en presencia de lindano. Ambos resultados, muestran que el lindano produce estrés a la cianobacteria, y ésta aumenta la expresión de dicha proteína con la cual obtiene una mayor tolerancia al pesticida. FurC a su vez regula la expresión del gen *prxA*, que también ve aumentada su expresión en presencia de lindano como se ha observado en el apartado 5.2.1. de Resultados. Así pues, *Anabaena* reacciona al estrés producido por el γ-lindano aumentando la expresión de *furC*, que aumenta la tolerancia de la célula al pesticida y además aumenta la expresión del gen *prxA* lo que contribuirá también a incrementar la tolerancia.

7. Conclusiones:

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se extraen las siguientes conclusiones:

- *Anabaena* PCC7120 presenta alta tolerancia a lindano a tiempos cortos y a dosis comprendidas entre 0,1 mg/L y 5 mg/L.
- A pesar de que el DMSO resulta ser un buen solvente para disolver compuestos con baja solubilidad, en este trabajo se ha encontrado que afecta a la expresión de algunos genes en *Anabaena*, induciendo o reprimiendo dicha expresión en función del gen estudiado.
- Genes de estrés oxidativo han visto aumentada su expresión en presencia de γ -lindano tanto en *Anabaena* (*furC* y *prxA*) como en *Microcystis aeruginosa* (*prxA*), lo cual nos permite afirmar que el lindano es un agente productor de estrés oxidativo en cianobacterias.
- La proteína LinE propuesta en este trabajo podría formar parte de la ruta utilizada por *Microcystis* para degradar lindano.
- La sobreexpresión de FurC aumenta la tolerancia de *Anabaena* al estrés oxidativo producido por γ -lindano.

Conclusions:

The results obtained in this work, permit conclude:

- *Anabaena* PCC7120 shows high tolerance to lindane in short periods of time and dosis ranging between 0,1 mg/L and 5 mg/L.
- Although the DMSO is a good solvent to dissolve compounds with low solubility, in this work it has been found that it affects gene expression in *Anabaena*, inducing or repressing the expression of some of the studied genes.
- Genes involved in oxidative stress response have increased their expression in presence of γ -lindane in *Anabaena* (*furC* and *prxA*) and in *Microcystis aeruginosa* (*prxA*), which allows us to confirm that lindane is an agent that triggers oxidative stress producer agent in cyanobacteria.
- LinE like protein identified in this work could be part of the lindane degradation pathway in *Microcystis*.
- FurC overexpression increases the tolerance of *Anabaena* to the oxidative stress produced by γ -lindane.

Bibliografía:

- Boileau, C., Eme, L., Brochier-Armanet, C., Janicki, A., Zhang, C. C., & Latifi, A. (2011). A eukaryotic-like sulfiredoxin involved in oxidative stress responses and in the reduction of the sulfinic form of 2-Cys peroxiredoxin in the cyanobacterium Anabaena PCC 7120. *New Phytologist*, 191(4), 1108–1118. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03774.x>
- Ceballos-Laita, L., Calvo-Begueria, L., Lahoz, J., Bes, M. T., Fillat, M. F., & Peleato, M. L. (2015). γ -Lindane increases microcystin synthesis in microcystis aeruginosa PCC7806. *Marine Drugs*, 13(9), 5666–5680. <http://doi.org/10.3390/md13095666>
- Chaurasia, A. K., Adhya, T. K., & Apte, S. K. (2013). Engineering bacteria for bioremediation of persistent organochlorine pesticide lindane (??-hexachlorocyclohexane). *Bioresource Technology*, 149, 439–445. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.084>
- Dennis, Solomon, F. (2015). Gamma Benzene Hexachloride Toxicity.
- Endo, R., Kamakura, M., Miyauchi, K., Ohtsubo, Y., Tsuda, M., Fukuda, M., & Nagata, Y. (2005). Identification and Characterization of Genes Involved in the Downstream Degradation Pathway of γ -Hexachlorocyclohexane in *Sphingomonas paucimobilis* UT26 Identification and Characterization of Genes Involved in the Downstream Degradation Pathway of γ -Hex. *Journal of Bacteriology*, 187(3), 847. <http://doi.org/10.1128/JB.187.3.847>
- Fernández, J., Arjol, M. A., & Cacho, C. (2013). POP-contaminated sites from HCH production in Sabiñánigo, Spain. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(4), 1937–1950. <http://doi.org/10.1007/s11356-012-1433-8>
- González, R., García-Balboa, C., Rouco, M., Lopez-Rodas, V., & Costas, E. (2012). Adaptation of microalgae to lindane: A new approach for bioremediation. *Aquatic Toxicology*, 109, 25–32. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.11.015>
- Kumari, R., Tecon, R., Beggah, S., Rutler, R., Arey, J. S., & van der Meer, J. R. (2011). Development of bioreporter assays for the detection of bioavailability of long-chain alkanes based on the marine bacterium *Alcanivorax borkumensis* strain SK2. *Environmental Microbiology*, 13(10), 2808–2819. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02552.x>
- Kuritz, T. (1998). Cyanobacteria as agents for the control of pollution by pesticides and chlorinated organic compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 85(S1), 186S–192S. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1998.tb05298.x>
- Kuritz, T., Bocanera, L. V., & Rivera, N. S. (1997). Dechlorination of lindane by the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120 depends on the function of the nir operon. *Journal of Bacteriology*, 179(10), 3368–3370.
- López-Gomol, S. O., Sevilla, E., Teresa BES, M., Luisa PELEATO, M., & Fillat, M. F. (2009). New insights into the role of Fur proteins: FurB (All2473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress. *Biochem. J*, 418, 201–207. <http://doi.org/10.1042/BJ20081066>
- M. Bueno, M.F. Fillat, Reto J. Straser, Ronald Maldonado-Rodriguez, Nerea Marina, Hensy Smiek, C. G.-M. and F. B. (2004). Effects of lindane on the photosynthetic apparatus of the cyanobacterium *Anabaena*.
- Miyazaki, R., Bertelli, C., Benaglio, P., Canton, J., De Coi, N., Gharib, W. H., ... van der Meer, J. R. (2015). Comparative genome analysis of *Pseudomonas knackmussii* B13, the first bacterium known to degrade chloroaromatic compounds. *Environmental Microbiology*, 17(1), 91–104.

<http://doi.org/10.1111/1462-2920.12498>

- Nagata, Y., Endo, R., Ito, M., Ohtsubo, Y., & Tsuda, M. (2007). Aerobic degradation of lindane (??-hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(4), 741–752. <http://doi.org/10.1007/s00253-007-1066-x>
- Nolan, K., Kamrath, J., & Levitt, J. (2012). Lindane toxicity: A comprehensive review of the medical literature. *Pediatric Dermatology*, 29(2), 141–146. <http://doi.org/10.1111/j.1525-1470.2011.01519.x>
- Prathap, M. U. A., Sun, S., Wei, C., & Xu, Z. J. (2015). A novel non-enzymatic lindane sensor based on CuO-MnO₂ hierarchical nano-microstructures for enhanced sensitivity. *Chemical Communications*, 51, 4376–4379. <http://doi.org/10.1039/C5CC00024F>
- Sangwan, N., Lata, P., Dwivedi, V., Singh, A., Niharika, N., Kaur, J., ... Lal, R. (2012). Comparative Metagenomic Analysis of Soil Microbial Communities across Three Hexachlorocyclohexane Contamination Levels. *PLoS ONE*, 7(9), 1–12. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0046219>
- Sevilla, E., Yuste, L., & Rojo, F. (2015). Marine hydrocarbonoclastic bacteria as whole-cell biosensors for n-alkanes. *Microbial Biotechnology*, 8(4), 693–706. <http://doi.org/10.1111/1751-7915.12286>
- T. Kuritz, P. W. (1995). Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic pollutants.
- van der Meer, J. R., & Belkin, S. (2010). Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 8(7), 511–522. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2392>
- Verma, H., Kumar, R., Oldach, P., Sangwan, N., Khurana, J. P., Gilbert, J. a, & Lal, R. (2014). Comparative genomic analysis of nine *Sphingobium* strains: insights into their evolution and hexachlorocyclohexane (HCH) degradation pathways. *BMC Genomics*, 15(1), 1014. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1014>
- Vijgen, J., Abhilash, P. C., Li, Y. F., Lal, R., Forter, M., Torres, J., ... Weber, R. (2011). Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs-a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(2), 152–162. <http://doi.org/10.1007/s11356-010-0417-9>
- Wooltorton, E. (2003). Concerns over lindane treatment for scabies and lice. *Cmaj*, 168(11), 1447–1448.
- Yingping, F., Lemeille, S., Talla, E., Janicki, A., Denis, Y., Zhang, C. C., & Latifi, A. (2014). Unravelling the cross-talk between iron starvation and oxidative stress responses highlights the key role of PerR (alr0957) in peroxide signalling in the cyanobacterium *NostocPCC 7120*. *Environmental Microbiology Reports*, 6(5), 468–475. <http://doi.org/10.1111/1758-2229.12157>