



Universidad de Zaragoza • Facultad de Ciencias



• Trabajo de Fin de Grado •

Estudio de la degradación de isómeros de lindano en
muestras complejas procedentes de Bailín

Lindane isomers degradation

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

Sara Abizanda Campo

Curso 2016/2017



Tabla de contenido

1.	Resumen / Abstract	1
1.1.	Resumen	1
1.2.	Abstract	1
2.	Introducción	2
2.1.	Lindano: un problema global	2
2.2.	El lindano en Sabiñánigo (Aragón)	3
2.3.	Degradación del lindano y sus isómeros por microorganismos	4
2.4.	Ruta de degradación del lindano en bacterias y cianobacterias	5
2.4.1.	Ruta de degradación del lindano en <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	5
2.4.2.	Degradación del lindano en <i>Anabaena</i>	5
3.	Objetivos	6
4.	Materiales y métodos	6
4.1.	Cepas y medios de cultivo	6
4.2.	Estudio del efecto del α -HCH, γ -HCH (lindano) y mezcla de isómeros de HCHs	7
4.2.1.	Cultivo en un medio líquido: curvas de crecimiento	7
4.2.2.	Estudios en placa	7
4.2.3.	Cultivos para el estudio de la expresión génica	8
4.2.4.	Cultivos para valorar la degradación de isómeros llevada a cabo por <i>Anabaena</i> PCC7120	8
4.3.	Métodos analíticos	8
4.3.1.	Determinación de proteína	8
4.3.2.	Determinación de clorofila <i>a</i>	9
4.3.3.	Determinación de ficobiliproteínas	9
4.3.4.	Determinación de carotenos	9
4.4.	Aislamiento y análisis de RNA de <i>Anabaena</i> PCC7120	10
4.4.1.	Toma de muestra para RNA de <i>Anabaena</i> PCC7120	10



4.4.2.	Extracción del RNA y tratamiento con DNasa I	10
4.4.3.	Electroforesis del DNA	11
4.4.4.	Cuantificación del RNA	11
4.4.5.	Comprobación de la pureza del RNA aislado	12
4.4.6.	Retrotranscripción	12
4.4.7.	Estudio de la amplificación de fragmentos de genes de interés mediante PCR a tiempo real	12
5.	Resultados	13
5.1.	Tolerancia de la cianobacteria <i>Anabaena</i> PCC7120 al α -HCH, γ -HCH (lindano) y mezcla de isómeros de HCHs	13
5.1.1.	Curva de crecimiento con α -HCH, γ -HCH (lindano) y mezcla de isómeros de HCHs	13
5.1.2.	Curva de crecimiento con distintas concentraciones de mezcla de isómeros de HCHs (mezcla turca)	14
5.2.	Efecto de α -HCH, γ -HCH (lindano) y mezcla de isómeros de HCHs sobre el contenido de clorofila a, proteína total, ficobiliproteínas y carotenos	14
5.2.1.	Normalización de los datos sobre el efecto del α -HCH, γ -HCH (lindano) y mezcla de isómeros de HCHs en <i>Anabaena</i> PCC7120	16
5.3.	Estudio de la expresión génica mediante PCR a tiempo real	17
5.3.1.	Cambios en la expresión de genes en presencia de α -HCH	17
5.3.2.	Cambios en la expresión de genes en presencia de γ -HCH (lindano)	18
5.4.	Estudios de degradación	19
5.5.	Estudio de tolerancia en placa: aumento de la viabilidad mediante la sobreexpresión de la proteína furC	20
6.	Discusión	21
6.1.	Tolerancia de <i>Anabaena</i> PCC7120 a γ -HCH (lindano), α -HCH y mezcla de isómeros de HCHs	21
6.2.	Capacidad de degradación de isómeros α -HCH y γ -HCH por parte de la cianobacteria <i>Anabaena</i> PCC7120	22
6.3.	Expresión génica	22



7. Conclusiones.....	23
8. Bibliografía.....	24
Referencias	24
9. Material suplementario	
9.1. Ruta de degradación en <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	
9.2. Programa de la PCR a tiempo real y procedimiento matemático utilizado para determinar el cambio en la expresión génica	
9.3. Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR a tiempo real	

1. Resumen / Abstract

1.1. Resumen

La contaminación por hexacloroclorohexanos (HCH), entre los que destaca el lindano, constituye actualmente un problema de contaminación ambiental de afectación global que presenta uno de sus máximos focos de contaminación en el municipio aragonés de Sabiñánigo.

La degradación por microorganismos se ha propuesto como una solución potencial, ya que se ha descrito que ciertos microorganismos son capaces de degradarlo. En este trabajo se llevó a cabo un estudio tanto de la afectación como de la tasa de degradación de la cianobacteria *Anabaena* PCC7120 ante la presencia de distintas concentraciones de distintos isómeros (alfa-HCH, gamma-HCH (lindano) y mezcla turca de isómeros de HCHs). El crecimiento de *Anabaena* PCC7120 y el contenido en clorofila *a* no se vieron afectados en presencia de los isómeros alfa y gamma pero sí en presencia de la mezcla de isómeros. *Anabaena* PCC7120 fue capaz de degradar prácticamente la totalidad del isómero gamma (lindano) en una semana en las concentraciones estudiadas; y el 50% del isómero alfa. Adicionalmente, el estudio de la variación de la expresión génica indicó que los genes *linB* y *linE* de *Anabaena* PCC7120 se encontraban ligeramente inducidos en presencia del isómero gamma pero no en el alfa. Finalmente, se llevó a cabo un estudio de los cambios en la expresión de los genes *nirA* y *prxA*, relacionados con la asimilación de nitrato y con el estrés oxidativo, respectivamente, en presencia de isómero alfa y gamma. El gen *nirA* no presentó cambios significativos pero el gen *prxA* presentó una inducción en presencia de ambos isómeros.

1.2. Abstract

Contamination by hexachlorocyclohexanes (HCH), mainly lindane, is a global environmental pollution problem which has one of its more critical items in Sabiñánigo (Spain).

Degradation by microorganisms has been suggested as a potential solution, since some microorganisms have been evidenced to degrade HCHs isomers. A study of affectation and degradation has been performed in the cyanobacteria *Anabaena* PCC7120 exposed to different concentrations of the various isomers. The growth rate and the amount of chlorophyll *a* did not show any alteration in presence of alpha and gamma isomers, but it showed an alteration with the delta isomer. *Anabaena* PCC7120 was able to degrade the entirety of the gamma isomer (lindane) in one week, while it degraded around 50% of the alpha isomer in the same time.

Furthermore, the alteration in the gene induction indicated that *linB* and *linE* genes where induced in presence of gamma isomer (lindane) but not in presence of alpha isomer.

The nitrate-assimilation related gene (*nirA*), and the oxidative-stress related gene (*prxA*) expressions were also studied, but only *prxA* gene presented an induction in presence of alpha and gamma isomers of HCHs.

2. Introducción

2.1. Lindano: un problema global

El lindano ha sido uno de los pesticidas más ampliamente utilizados en todo el mundo desde 1930 hasta 1990. Su uso durante casi sesenta años ha tenido como consecuencia un problema de contaminación ambiental a nivel mundial (1).

El lindano se produce mediante cloración fotoquímica del benceno (Fig. 1). Pero en este proceso se obtiene como producto intermedio el HCH (hexaciclorohexano) técnico. Este producto intermedio contiene ocho isómeros del hexaclorociclohexano denominados desde α -HCH hasta θ -HCH, en base al ordenamiento espacial de los átomos de cloro. Solamente cinco isómeros (α , β , γ , δ y ϵ) son estables y se producen en las mezclas de reacción en los siguientes porcentajes aproximados: α 60-70 %; β 10-12 %; γ 12-16 %; δ 6-10 %, and ϵ 3-4 % (2).

Por medio de la destilación, el lindano se separaba del resto de los isómeros no comerciales del HCH técnico. La relación lindano/resto de isómeros era de 1 a 10 aproximadamente lo que supuso la generación de una gran cantidad de residuos.

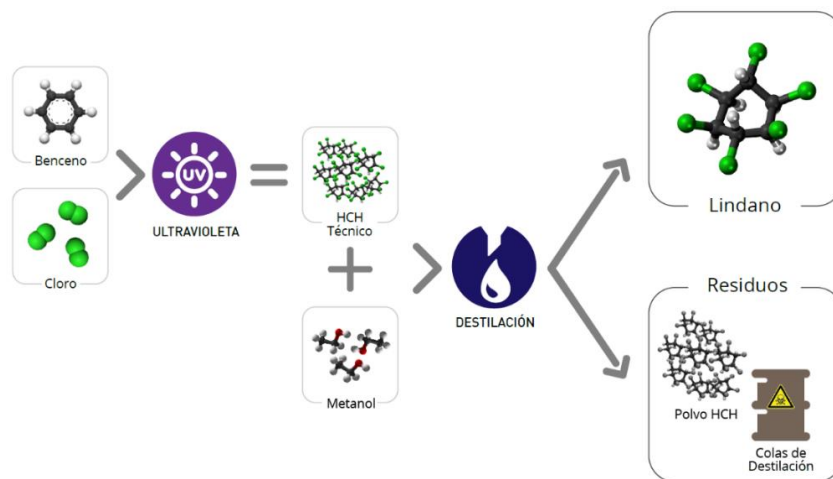


Figura 1: Proceso de fabricación industrial del lindano (3)

Entre 1940 y 1950, fue el HCH técnico el que fue utilizado como insecticida. Sin embargo, solamente el isómero gamma, que más tarde se denominó lindano, contenía propiedades insecticidas. Además, presentaba una menor persistencia y era potencialmente biodegradable. Por esa razón, a partir de 1950, se comenzó a aislar y comercializar este isómero únicamente.



Las cantidades de lindano estimadas acumuladas actualmente se indican en la Tabla 1. La cantidad de residuos de HCHs asociados serían 10 veces mayores (4).

Continente	Cantidad (1000 t)	Porcentaje
Europa	287.16	63.32
Asia	73.20	16.14
América	63.57	14.02
África	28.54	6.29
Oceanía	1.03	0.23
Total	435.50	100

Tabla 1: Estimación del lindano acumulado (1)

El lindano y el resto de compuesto organoclorados, son sustancias persistentes y bioacumulables (5). Pueden transmitirse a través de las cadenas tróficas y transportarse mediante el viento y el agua (6). La exposición a grandes cantidades de HCHs, por ingestión, inhalación o contacto provoca dolor de cabeza, cansancio, debilidad, malestar, insomnio, diarreas, vómitos, fiebre e incluso la muerte en casos extremos. A pequeñas dosis, pero exposiciones largas (toxicidad crónica) produce problemas hepáticos, renales, hormonales y sanguíneos (anemias). Causa también desregulaciones endocrinas y daños en el sistema nervioso central, por interacción con el receptor del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA). Además, al tratarse de un compuesto apolar, puede traspasar la materia blanca, rica en lípidos, del cerebro. Estudios en ratones evidencian que podría tratarse de una sustancia cancerígena en humanos, y así recomienda tratarla la OMS (2) (6).

El lindano ha sido prohibido en al menos 52 países y ha sido incluido en varios acuerdos multilaterales internacionales. En 2009 varios isómeros de HCH (α , β y γ) fueron incluidos en la lista de Contaminantes Orgánicos Persistentes (POPs: Persistent Organic Pollutants) de la Convención de Estocolmo (1).

2.2. El lindano en Sabiñánigo (Aragón)

En España, el lindano fue producido por cuatro fábricas: dos de ellas situadas en el País Vasco, una en Galicia y otra en la provincia de Huesca, esta última fue en concreto la planta de Inquinosa en Sabiñánigo. La fábrica Inquinosa sintetizó lindano desde 1975 hasta 1989, cesando completamente su actividad en 1992. Durante su actividad, se estima que produjo más de 150000 toneladas de residuos con alto contenido en HCH y otros compuestos organoclorados. Éstos, se depositaron de manera incontrolada en el vertedero de Sardas y posteriormente, de manera algo más controlada, en el de Bailín.

Las consecuencias de esta actividad industrial han constituido un problema de contaminación muy grave que lo convierte en un auténtico reto medioambiental. Los problemas a los que se enfrentan los investigadores y las autoridades competentes son los siguientes:

1. La naturaleza tóxica, cancerígena, bioacumulable, biomagnificable y persistente de los contaminantes.
2. La contaminación multicomponente y multiafección.
3. El gran volumen de los residuos.
4. La presencia de una fase libre densa organoclorada (DNAPL).
5. La geología compleja y desfavorable de la zona.
6. La proximidad de los vertederos al casco urbano de Sabiñánigo y al río Gállego (afluente del Ebro de 200 km de longitud, cuenca de 4020 km² de superficie y una gran diversidad ecológica, además de embalses a lo largo de su recorrido) que propicia el consumo humano aguas abajo. Además, de que el 60% de la superficie de la cuenca del río tiene uso agrícola.

En 25 años de lucha contra el lindano, el gobierno de Aragón ha invertido más de 54 millones de euros y planea invertir otros 550 millones en los próximos 25 años, con ayuda de instituciones españolas y europeas, en busca de una solución definitiva para el problema del lindano y los HCHs (3).

2.3. Degradación del lindano y sus isómeros por microorganismos

A pesar de la alta persistencia de los hexaclorociclohexanos (HCH), la biorremediación se presenta como una solución potencial para este problema, ya que existen varios microorganismos capaces de degradar estos compuestos. Varios de ellos han sido identificados, como algunos hongos, cianobacterias y bacterias anaerobias; pero muy pocos se han estudiados a fondo y pocas son las rutas de degradación conocidas (7). Se ha aplicado con éxito la biorremediación en distintas condiciones, tanto en suelos aerobios como anaerobios (8) (9).

Un mayor conocimiento de la presencia y capacidad degradativa de los organismos degradadores de HCHs nos permitirá crear una tecnología basada en la biorremediación más precisa y efectiva. En estudios recientes, se ha analizado la distribución, diversidad y especificidad de sustrato de los microorganismos presentes en suelos españoles con distintos niveles de isómeros de HCH contaminantes y se han detectado diferencias notables en las comunidades microbianas presentes. (7) En estos estudios se observó que los isómeros alfa y gamma presentaban una mayor tasa de degradación por parte de un mayor número de microorganismos. En la mayoría de suelos había organismos capaces de degradar ambos isómeros, que además tenían especificidad de sustrato parecidas: los que no degradaban α -HCH tampoco degradaban γ -HCH. Los isómeros β -HCH y δ -HCH parecían ser los más persistentes y difíciles de biodegradar (7).

El estudio sugirió que los degradadores de HCHs no proliferaban en suelos no contaminados con HCHs y que el tipo de contaminación selecciona la población de microorganismos *in situ* (7).

2.4. Ruta de degradación del lindano en bacterias y cianobacterias

La ruta de degradación del lindano ha sido descrita en detalle en la bacteria *Sphingomonas paucimobilis* (10) sin embargo, no se ha descrito en cianobacterias, como es el caso de *Anabaena* PCC7120.

2.4.1. Ruta de degradación del 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 (2). El proceso comienza con una deshidrocloración llevada a cabo por una deshidroclorinasa (*linA*), posteriormente actúa una haloalcano deshalogenasa (*linB*) y en 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 en succinil-coA y acetil-coA por la acción de distintas enzimas en la ruta downstream. La declorinasa reductiva (*linD*) es la responsable de la eliminación de átomos de cloro de la molécula. A continuación, se produce la escisión del anillo por una oxigenasa (*linE*) y finalmente actúa una maleilacetato reductasa (*linF*), una acetil-coA transferasa (*linG*, *linH*) y una tiolasa (*linJ*). Al final del proceso, el succinil-coA y acetil-coA entran en el ciclo de Krebs y son utilizados como fuente de carbono y energía, habiendo reducido el lindano completamente a CO₂ y H₂O (Figura _ material suplementario). En *Sphingomonas paucimobilis*, los genes *linA*, *linB* y *linC* no forman parte de ningún operón, sin embargo, *linD* y *linE* parecen formar parte de un operón cuya expresión está regulada por el activador transcripcional *LinR*. Además, se ha descrito que *linA*, *linB* o *linC* se expresan de manera constitutiva, mientras que *linD* o *linE* pueden ser inducidos en presencia de determinados intermediarios metabólicos por la activación mediada por *linR* (2) (11) (12).

2.4.2. Degradación del 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 N₂ del aire y reducirlo a amonio (NH₄⁺), incorporando nitrógeno a la cadena trófica (13). Se ha demostrado que las cianobacterias pueden llegar a ser organismos muy versátiles con un uso potencial en biorremediación ya que pueden acumular y degradar compuestos tóxicos. Concretamente, en algunos estudios se ha comprobado que son capaces de degradar el lindano (14) (15) Una de las cianobacterias capaces de degradar lindano es *Anabaena* (16). 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 aproximadamente tres a cinco días, dependiendo de la densidad celular inicial. En ausencia de nitrato, el lindano se degrada mucho más lentamente (16). Vista la influencia de la disponibilidad de nitrato, los autores estudiaron el efecto de mutaciones en el operón *nir* (5- *nirA*- *nrtABCD* -*narB*- 3), que codifica la nitrito y nitrato reductasa, así como proteínas de transporte de nitrógeno en la degradación de lindano y observaron que la cianobacteria no era capaz de llevar a cabo la dechlorinación, incluso en presencia de nitrato (16). Otros factores que se han descrito que afectan a la capacidad de degradación del lindano son la oscuridad y la presencia de amonio, ya que son inhibidores de las funciones del operón *nir* (16). De acuerdo con estos resultados, la nitrato reductasa podría ser una enzima esencial en la degradación del lindano y se especula que la dechlorinación de éste puede ser una función de un complejo de reducción nitrato-nitrito de la membrana (16). A pesar de la importancia del hecho de que *Anabaena* es capaz de degradar lindano, las rutas implicadas en la degradación de este compuesto se desconocen, y su estudio y caracterización son un reto para el futuro próximo en la búsqueda de la solución al problema que este compuesto presenta.

3. Objetivos

- Estudiar la tolerancia de la cianobacteria *Anabaena* PCC7120 a los isómeros α -HCH, γ -HCH y a la mezcla de isómeros de HCHs.
- Estudio del efecto de los isómeros α -HCH, γ -HCH y de la mezcla de isómeros de HCHs sobre la concentración intracelular de proteína total, clorofila *a*, ficobiliproteínas y carotenoides.
- Estudio de degradación de los isómeros α -HCH, γ -HCH y la mezcla de isómeros de HCHs por *Anabaena* PCC7120.
- Estudio transcripcional de cambios en la expresión de genes homólogos de la familia *lin* potencialmente implicados en la ruta de degradación de HCH de *Anabaena* PCC7120; así como de genes asociados con procesos de asimilación de nitratos y estrés oxidativo.

4. Materiales y métodos

4.1. Cepas y medios de cultivo

La cepa de cianobacterias que se ha utilizado es *Anabaena* PCC7120, de la colección de cultivos del instituto Pasteur y la cepa mutante EB2770. Esta cepa mutante expresa la proteína FurC (17). El medio de cultivo utilizado fue BG11 esterilizado (18). La solución de macronutrientes contiene: 1.35 g/L de NaNO_3 , 0.738 g/L de NaHCO_3 , 0.04 g/L de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$, 0.036 g/L de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 0.075 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ y 0.02 g/L de Na_2CO_3 . Esta solución se esterilizó en el autoclave. Posteriormente, se le añadió 1 ml de solución de micronutrientes, esterilizado por filtración. La solución de micronutrientes está formada por: 6 g/L de citrato férrico amónico, 6 g/L de ácido

cítrico, 1 g/L de EDTA, 2.86 g/L de H_3BO_3 , 1.81 g/L $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 0.138 g/L de $\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0.39 g/L de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0.079 g/L de $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ y 0.0494 g/L de CoCl_2 .

4.2. Estudio del efecto del α -HCH, γ -HCH (lindano) y mezcla de isómeros de HCHs

4.2.1. Cultivo en un medio líquido: curvas de crecimiento

Para realizar el experimento de seguimiento del crecimiento durante 15 días, se prepararon en erlenmeyers de 250 ml conteniendo 100 ml de cultivo con una densidad óptica inicial de 0.2 aproximadamente.

Los pesticidas utilizados fueron los siguientes:

- **Isómero alfa HCH** tipificado proveniente del laboratorio de seguimiento y control del Gobierno de Aragón de Sabiñánigo, de 84.6% de pureza.
Se preparó una solución stock de 20 g/L disolviendo 0.024 g de α -HCH en 1 ml de DMSO. A continuación, se añadieron 10 μL de stock en 100 ml de cultivo, obteniendo una concentración final de 2 mg/L.
- **Isómero gamma (lindano)** comercial de 97% de pureza de la compañía Sigma-Aldrich.
Se preparó una solución stock de 70 g/L disolviendo 0.072 g de α -HCH en 1 ml de DMSO. A continuación, se añadieron 10 μL de stock en 100 ml de cultivo, obteniendo una concentración final de 7 mg/L.
- **Mezcla de isómeros de HCH** Lindano turco 11-1982 (33.1% de α -HCH, 2.3% de β -HCH, 5.9% de γ -HCH, 3.3% de δ -HCH y 0.8% de ϵ -HCH) proveniente del laboratorio de seguimiento y control del Gobierno de Aragón de Sabiñánigo, con una pureza del 45%.
Se diluyeron 0.2 g de lindano turco en 1 ml de DMSO para obtener una concentración stock de 10 g/L. A continuación, se añadieron 10 μL del stock en 100 ml, obteniendo una concentración final de 10 mg/L. Para obtener las concentraciones de 1, 2 y 5 mg/L se prepararon añadiendo 1, 2 y 5 μL respectivamente de la solución stock de 10 g/L en 100 ml de cultivo.

Para llevar a cabo la curva de crecimiento, se tomó 1 ml de cultivo, en esterilidad, de cada una de las muestras: control, α -HCH, γ -HCH (lindano) y mezcla de isómeros de HCHs; con dos réplicas biológicas cada uno y se midió su densidad óptica a $\lambda = 750 \text{ nm}$.

4.2.2. Estudios en placa

Se realizó un estudio en placa de la tolerancia al isómero α -HCH y a la mezcla de isómeros de HCHs donde se comparó una cepa salvaje (*Anabaena* PCC7120) y una cepa mutante (EB2770) que sobreexpresaba la proteína FurC (15). La mezcla de isómeros utilizada fue lindano turco 11-1982. Se prepararon unas soluciones stock de 2 g/L para el isómero α -HCH y la mezcla de isómeros, realizando una dilución 1:10, donde se añadió 50 μL de 20 g/L de cada una de las soluciones a 450 μL de DMSO. Añadiendo en cada caso 1 μL , 0.5 μL , 0.25 μL y 0.1 μL , se obtuvieron

unas concentraciones de 20 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L y 1 mg/L respectivamente. La concentración de DMSO que se añadió a cada pocillo fue del 0,01%. El experimento se llevó a cabo por cuadruplicado, con pocillos control a los que no se añadió ningún compuesto, así como pocillos en los que se añadió el mismo volumen de DMSO para comprobar su efecto en la supervivencia de las cianobacterias.

4.2.3. Cultivos para el estudio de la expresión génica

Se establecieron distintos cultivos en erlenmeyers de 250 ml con un volumen de cultivo de 100 ml y se fijó la densidad óptica a aproximadamente 0.3. Los cultivos fueron: cultivo control con *Anabaena* PCC7120, cultivo con células y distintas concentraciones de isómero α -HCH, γ -HCH o mezcla de isómeros de HCHs; y cultivos con células con DMSO (para conocer su efecto en la expresión génica). La concentración de los isómeros se especificará en cada experimento. Se realizaron dos réplicas biológicas de cada cultivo. Los experimentos se llevaron a cabo en un incubador con luz (intensidad lumínica de $30 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y con agitación constante a 200 rpm.

4.2.4. Cultivos para valorar la degradación de isómeros llevada a cabo por

Anabaena PCC7120

Los experimentos de degradación se realizaron con el isómero α -HCH y γ -HCH y se llevaron a cabo en las mismas condiciones que el experimento anterior de expresión génica. Las muestras consistían en dos réplicas de medio con isómero (sin células) como control y dos réplicas biológicas de células con los respectivos isómeros. Se tomaron 10 ml de las muestras control (medio con isómeros y sin células) a tiempo $t = 0$ días y $t = 7$ días como control de la evaporación y la degradación química; y del medio con células a $t = 7$ días para estudiar la degradación llevada a cabo por *Anabaena*. Se enviaron congelados al laboratorio de Sabiñánigo para su análisis.

4.3. Métodos analíticos

4.3.1. Determinación de proteína

Este método permite la extracción de proteína total soluble presente en los extractos del cultivo de *Anabaena* PCC7120. Los extractos se obtuvieron a partir de las células, según el siguiente procedimiento:

- Se centrifugaron 5 ml de células en tubos Falcon a 1700 g durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante.
- Se resuspendieron las células en 500 μl de Tris-HCl 50 mM, pH = 8, 10% glicerol.
- Se añadió 5 μl de inhibidor de proteasas PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) para alcanzar una concentración final de 1 mM.

- Las células se rompieron mediante sonicación, con ciclos de 1 minuto descansando 45 segundos entre cada ciclo. Con una amplitud del 80% y ciclo 0.5. El proceso se lleva a cabo en baño de hielo.
- Se centrifugan las muestras 30 minutos a 17900 g.
- Para la determinación de proteína se utilizó el sobrenadante, que constituye el extracto crudo.
- Se cuantifico la proteína total en el extracto crudo utilizando el método del BCA, aplicando el protocolo de la casa comercial ThermoFisher.

4.3.2. Determinación de clorofila *a*

Se determinó el contenido de clorofila *a* de los cultivos celulares utilizando un método espectrofotométrico, aplicando el procedimiento descrito por Mackinney (1941). Partiendo de 1 ml de cultivo, se centrifugó a 15300 g durante 5 minutos. Se resuspendió el precipitado en 1 ml de etanol y tras un minuto de agitación en vórtex, se centrifugó la suspensión a 17900 g durante 5 minutos. Debido a que la clorofila *a* se degrada en presencia de luz, el procedimiento se llevó a cabo en oscuridad. La concentración de clorofila *a* en el sobrenadante se determina en función de la absorbancia a $\lambda = 665$ nm, utilizando el coeficiente de absorción molar de la clorofila *a*, $\epsilon = 74.46$ (mg/ml)⁻¹cm⁻¹.

$$Chla \left(\frac{mg}{ml} \right) = \frac{Abs_{665}}{74,46 \frac{mg}{ml \times cm} \times 1 cm}$$

4.3.3. Determinación de ficobiliproteínas

Se utilizó el método descrito por Glazer et al en 1976.

- Se centrifugaron 5 ml de cultivo a 1700 g durante 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante.
- Se lavaron las células con TRIS 50 mM pH 8. Se repitió este paso.
- Se resuspendieron las células en 5 ml de agua destilada. Se sonicaron las células 5 veces con ciclos de 45 segundos y pausas de 30 segundos. Con una amplitud del 80% y ciclo 0.5. El proceso se lleva a cabo en baño de hielo.
- Se midió la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 620 nm.
- La concentración de ficobiliproteínas se calculó con la siguiente fórmula:

$$Concentracion \text{ ficobiliproteínas} = \left(\frac{mg}{ml} \right) \frac{Abs_{620}}{\epsilon l} = \frac{Abs_{620}}{7.41 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1} 1 \text{ cm}}$$

4.3.4. Determinación de carotenos

Se utilizó el método descrito por Davies et al en 1976.

- Se centrifugaron 5 ml de cultivo a 1700 g durante 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante.
- Se lavaron las células con 5ml de agua destilada. Se repitió este paso.

- Se resuspendieron las células en 5 ml de agua destilada. Se sonicaron las células 5 veces con ciclos de 45 segundos y pausas de 30 segundos. Con una amplitud del 80% y ciclo 0.5. El proceso se llevó a cabo en baño de hielo.
- Se añadieron cuatro volúmenes de acetona y se centrifugó a 2500 g durante 5 minutos a 4°C.
- Se midió la absorbancia del sobrenadante a unas longitudes de onda de 480 nm, 465 nm y 663 nm. Se utilizó como blanco acetona al 80%.
- La concentración de carotenos se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$Abs_{480} \text{ carotenoides} = Abs_{480} + 0.114 Abs_{663} - 0.638 Abs_{465}$$

$$Concentracion \text{ carotenoides} \left(\frac{mg}{ml} \right) = \frac{Abs_{480} \text{ carotenoides}}{\epsilon l} = \frac{Abs_{480}}{250 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1} \text{ 1cm}}$$

4.4. Aislamiento y análisis de RNA de *Anabaena PCC7120*

4.4.1. Toma de muestra para RNA de *Anabaena PCC7120*

La presencia de RNAsas es un elemento a tener en cuenta para el éxito de la extracción de RNA, por lo que debemos llevar a cabo una serie de precauciones para evitar la degradación del RNA. El proceso se llevó a cabo con agua DEPC (dietilpirocarbonato) libre de RNAsas, el material se autoclavó previamente a su uso, se utilizaron puntas con filtro y tanto la campana como el material utilizados se lavaron con NaOH 0.4 M. El procedimiento llevado a cabo fue el siguiente:

- Se tomaron 25 ml de cultivo con una densidad óptica deseada y se centrifugó a 1700 g durante 5 minutos, a 4°C.
- Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en el medio restante. Se trasvasó a un eppendorf de seguridad (para trabajar con solventes orgánicos) de 2 ml libre de RNAsas.
- Se centrifugó 5 minutos a 15300 g y 4°C y se eliminó el sobrenadante.
- Se resuspendió el pellet en 600 µl de Tris-HCl 50 mM, 100 mM EDTA a pH = 8 y se añadieron 130 µl de cloroformo.
- Se mezcló varias veces por inversión.
- Se incubó 3 minutos en hielo.
- Se centrifugó durante 5 minutos a 15300 g y 4°C. Se obtuvieron tres fases: una superior acuosa, una intermedia formada por células y una inferior que contiene el cloroformo.
- Se eliminó la fase superior acuosa. Se atravesó la interfase con una punta 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 posterior uso.

4.4.2. Extracción del RNA y tratamiento con DNasa I

- A la muestra de células descongelada se le añadió: 300 µl de buffer de resuspensión (Sacarosa 0.3 M, acetato de sodio 10 mM, pH = 4.5), 100 µl de disolución 250 mM EDTA disódico, pH = 8; 400 µl de buffer de lisis (2% SDS, 10 mM acetato de sodio, pH = 4.5) y finalmente 1 ml de fenol ácido a 65°C.

- Se agito durante 30 segundos en el vórtex. Se incubó durante 2.5 minutos a 65°C. Se repitió este paso dos veces. Se centrifugó 5 minutos a 17900 g. Se transfirió la fase superior acuosa a un eppendorf nuevo.
- Se añadió 1 ml de trizol. Se agitó en vórtex 30 segundos. Se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se añadieron 200 µl de cloroformo, se agitó en vórtex durante 30 segundos y se dejó reposar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a 17900 g durante 5 minutos y se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo.
- Se añadió un volumen de cloroformo y se agitó en vórtex durante 30 segundos.
- Se centrifugó 5 minutos a 17900 y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf. Se repitió este paso.
- Se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto frío a la fase acuosa. Se agitó en vórtex y se almacenó a -80°C durante una noche.
- Una vez descongelada, se centrifugó a velocidad máxima y 4°C durante 30 minutos.
- Se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µl de etanol frío al 70%. Se centrifugó durante 5 minutos a la máxima velocidad y a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente.
- Se resuspendió el pellet en 90 µl de agua DEPC. Se añadieron 10 µl de buffer de DNAsa y 2 µl de DNAsa libre de RNAsas. Se incubó durante 70 minutos a 37°C y a continuación a 65°C durante 10 minutos para inactivar la enzima. El proceso se llevó a cabo en un termociclador.
- El RNA extraído se conservó a -80°C hasta su uso.

4.4.3. Electroforesis del DNA

Se sometió el RNA extraído a una electroforesis en gel de agarosa al 1% para comprobar la integridad del RNA. La electroforesis se llevó a cabo con un voltaje de 90V utilizando una fuente BioRad PowerPac300. Los resultados se visualizaron con un equipo GelDoc200 (BioRad) y el programa MultiAnalist 1.1 (BioRad Laboratorios, 1997).

4.4.4. Cuantificación del RNA

Para calcular la concentración y pureza del RNA se utilizaron medidas espectrofotométricas. Los ácidos nucleicos presentan un máximo de absorción a 260 nm. Midiendo la absorbancia a 260 nm y comparándola con referencias establecidas para una concentración conocida se puede deducir su concentración:

- Se utilizaron cubetas de cuarzo de 500 µl lavadas con NaOH y aclaradas con agua DEPC. Se realizó una línea base con agua DEPC entre 250 y 600 nm.
- Se añadieron 390 µl de agua DEPC a la cubeta y 10 µl de RNA total.
- Se llevó a cabo el espectro entre 250 y 600 nm registrando las absorbancias a 260 y 280 nm.
- Teniendo en cuenta que 1 unidad de A_{260} (ssRNA) = 40 µg/ml, se puede calcular la concentración de RNA a partir de su medida de A_{260} .

El ratio A_{260}/A_{280} indica la pureza de la muestra en cuanto a la presencia de proteínas en la muestra. Si esta relación se sitúa entre 1.8 y 2.0, la muestra presenta alta pureza en RNA.

4.4.5. Comprobación de la pureza del RNA aislado

Aunque las muestras fueron tratadas con DNAsas, es posible que el RNA obtenido se halle contaminado con DNA. La presencia de DNA en las muestras de RNA se evaluó mediante una Real Time PCR previa a la retrotranscripción. Se preparó una dilución con 2.5 μ l de RNA más 500 μ l de H₂O. Se preparó el mix del gen housekeeping *rnpB* tomando las cantidades adecuadas de SyBr Green, primer directo de *rnpB*, primer inverso de *rnpB* y H₂O DEPC. *rnpB* es un gen constitutivo que se utiliza como control interno de la expresión. Se dispensaron en una placa de 96 pocillos 20 μ l del mix y 10 μ l de dilución y se analizó en un equipo Viia™ 7 Real Time PCR System (Applied Biosystem) utilizando SYBR® Green Dye.

4.4.6. Retrotranscripción

Mediante la retrotranscripción se obtuvo cDNA total (ssDNA) complementario al RNA total aislado. La retrotranscripción se llevó a cabo utilizando “random primers”. La mezcla de reacción se componía de 1 μ l de “random primers” (300 ng/ μ l), 1.5 μ g de RNA, 2 μ l de tampón de hibridación 1x (Tris-HCl 10 mM (pH 8), EDTA 1 mM, KCl 150 mM, en stock 10x), y se completó el volumen hasta 20 μ l con H₂O DEPC. La retrotranscripción se llevó a cabo como se explica a continuación:

- Se desnaturalizó la muestra durante 10 minutos a 85°C y se llevó a cabo la hibridación de los “random primers” durante 1 hora a 50°C.
- Se añadieron 18 μ l de la mezcla compuesta por 2 μ l de mezcla de dNTPs 10 mM, 4 μ l DTT 0.1M, 8 μ l de tampón 5X y 4 μ l de H₂O.
- Se añadió 1 μ l de 200 U de la enzima SuperScript Retrotranscriptasa de GibcoBRL a cada muestra.
- Se completó el volumen hasta 20 μ l con 1 μ l de agua DEPC.
- La mezcla se incubó 1 h a 47°C para que tenga lugar la extensión de los cebadores. A continuación, se calentaron las muestras a 75°C durante 15 minutos para detener la reacción.
- Cuando finalizó el programa, las muestras se guardaron a 4°C.

4.4.7. Estudio de la amplificación de fragmentos de genes de interés mediante PCR a tiempo real

Se utilizó la Real Time PCR para determinar el cambio en la expresión génica mediante la cuantificación relativa de los transcritos, retrotranscritos a cDNA, del gen de estudio respecto a los transcritos de otro gen de referencia que debe ser constitutivo (“housekeeping”). En nuestro caso, se utilizó como gen de referencia el gen *rnpB*.

Para llevar a cabo la RT-PCR fue necesario preparar un mix específico para cada gen de estudio. El mix se compone de 12.5 μl /pocillo de SyBr Green, 0.2 μl /pocillo de primer inverso, 0.2 μl /pocillo de primer directo y 7.1 μl /pocillo de agua DEPC. En la placa, se añadieron a cada pocillo 20 μl de mix y 10 μl de cDNA a una dilución adecuada. Inicialmente, se llevó a cabo una recta patrón de cada uno de los genes utilizados, para asegurarnos de que la dilución utilizada era correcta. En la tabla 1 de Material Suplementario se adjunta el programa mediante el cual se llevó a cabo la Real Time PCR, además del tratamiento matemático que se utilizó para determinar la variación en la expresión.

5. Resultados

5.1. Tolerancia de la cianobacteria *Anabaena* PCC7120 al α -HCH, γ -HCH (lindano) y mezcla de isómeros de HCHs

5.1.1. Curva de crecimiento con α -HCH, γ -HCH (lindano) y mezcla de isómeros de HCHs

La concentración inicial de isómeros que se añadió a *Anabaena* PCC7120 fue de 2 mg/L de α -HCH, 7 mg/L de γ -HCH y 10 mg/L de mezcla turca de isómeros de HCH. Sin embargo, los isómeros del HCH no presentaron una solubilidad del 100%, y tras el análisis de las muestras por GC-masas, se comprobó que las concentraciones reales que se solubiliaron fueron las siguientes: 0,5 mg/L de α -HCH y 2 mg/L de γ -HCH. Una vez establecidos los cultivos, se tomaron datos de la absorbancia a 750 nm a tiempos, 0, 1, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 18, 20 y 22 días. Los resultados se muestran en la Figura 2, expresados en términos de absorbancia a 750 nm, correlativo al número de células presentes en el medio.

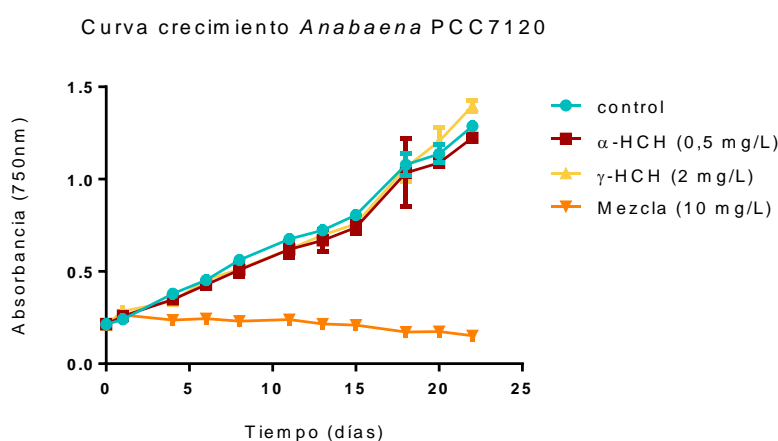


Figura 2: Curva de crecimiento de *Anabaena* PCC7120 en presencia de distintas concentraciones de isómeros y de mezcla de HCHs.

La Figura 2 muestra que los cultivos tratados con isómeros alfa y gamma mostraron unas tasas de crecimiento similares al cultivo control. Sin embargo, el cultivo que contenía la mezcla turca de HCH presentó una disminución drástica en el número de células. En estudios previos se había

comprobado que la presencia de DMSO utilizado para disolver los isómeros de lindano no afectaba al crecimiento de *Anabaena* (10).

5.1.2. Curva de crecimiento con distintas concentraciones de mezcla de isómeros de HCHs (mezcla turca)

En vista de los resultados obtenidos con 10 mg/L de mezcla de isómeros, llevamos a cabo curvas de crecimiento con concentraciones inferiores de la mezcla con la intención de conseguir una dosis que no resultase letal para las células de *Anabaena*. Las dosis utilizadas fueron 1 mg/L, 2 mg/L y 5 mg/L de mezcla turca de isómeros de HCH. Se tomaron datos de absorbancia a 750 nm a tiempos $t = 0, 1, 2, 4, 6, 8, 11, 13$ y 15 días. Los datos se muestran en la Figura 3.

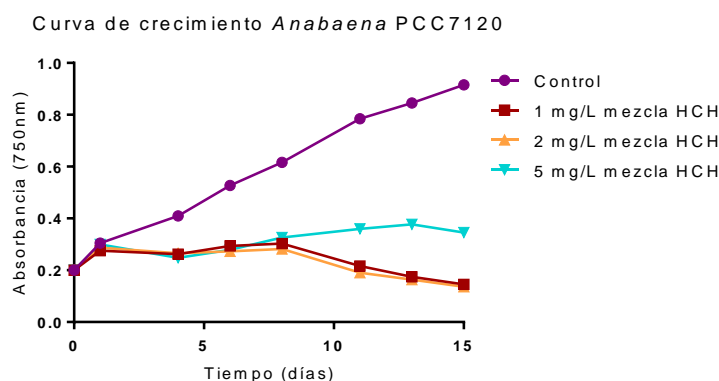


Figura 3: Curva de crecimiento de *Anabaena* con distintas concentraciones de la mezcla de isómeros y mezcla de HCH.

En la gráfica se aprecia que, a estas concentraciones, la mezcla de isómeros de HCH también afecta notablemente al crecimiento de la cianobacteria *Anabaena*. La concentración mínima estudiada que tiene efecto es 1 mg/L.

5.2. Efecto de α -HCH, γ -HCH (lindano) y mezcla de isómeros de HCHs sobre el contenido de clorofila *a*, proteína total, ficobiliproteínas y carotenos

Para estudiar el efecto que el isómero alfa, gamma y la mezcla de isómeros tenían sobre la proteína total, ficobiliproteínas, carotenos y clorofila *a* de *Anabaena* PCC7120, se establecieron cultivos de 100 ml en matraces de 250 ml con los distintos tratamientos. Se recogieron muestras durante 22 días y se determinaron en ellas los distintos parámetros. Los resultados de clorofila *a* y de proteína total se muestran en la Figura 4 y la Figura 5.

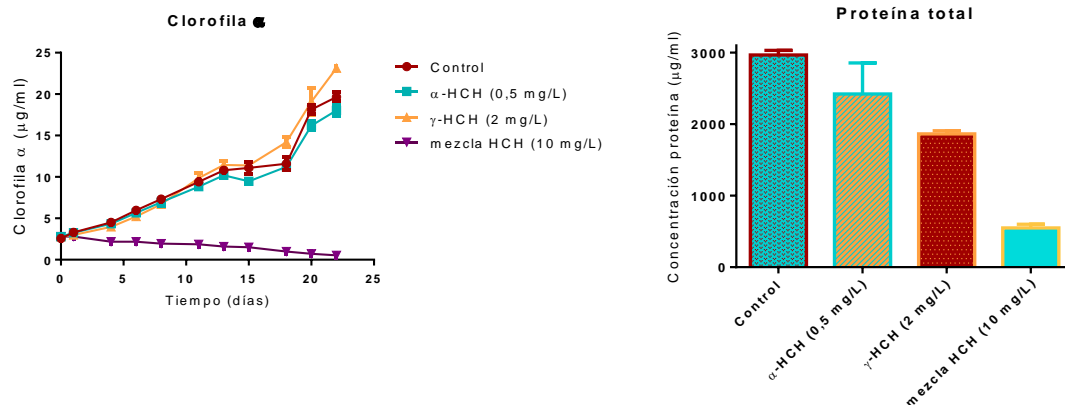


Figura 4: A) Concentración de clorofila a en presencia de isómero alfa, gamma y mezcla de HCHs B) Concentración de proteína total en presencia de isómero alfa, gamma y mezcla de HCHs

Respecto al contenido en clorofila a , salvo en presencia de la mezcla de isómeros de HCHs, donde se observa una drástica disminución; no se observan cambios significativos en presencia de los isómeros α y γ de HCH. El contenido en proteínas después de 20 días de tratamiento sí que se vio afectado. Se observaron variaciones significativas en presencia del isómero alfa, del isómero gamma y en presencia de la mezcla de isómeros, en los que se observa un descenso en el nivel de proteínas de aproximadamente un 20%, 40% y 80% respectivamente.

A continuación, se muestran los datos obtenidos del contenido de ficobiliproteínas y carotenoides.

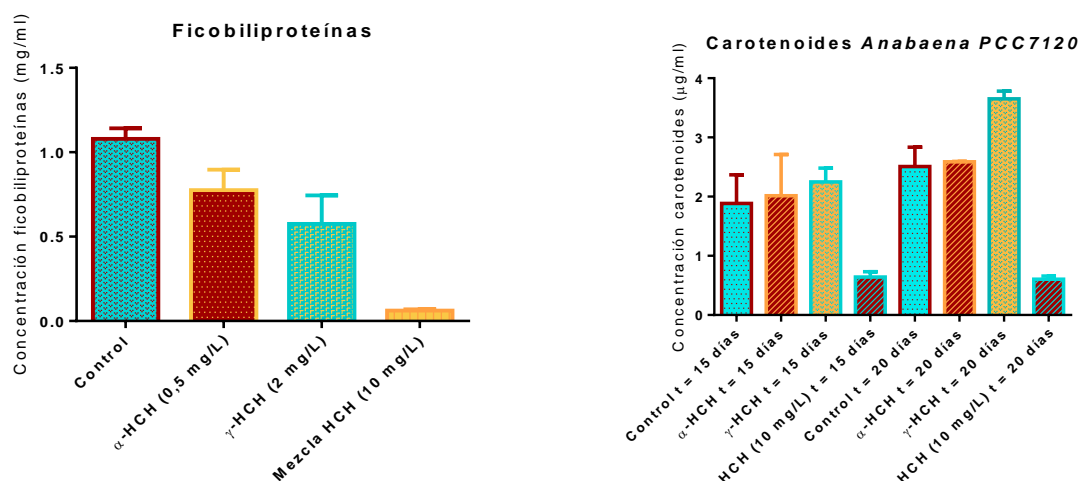


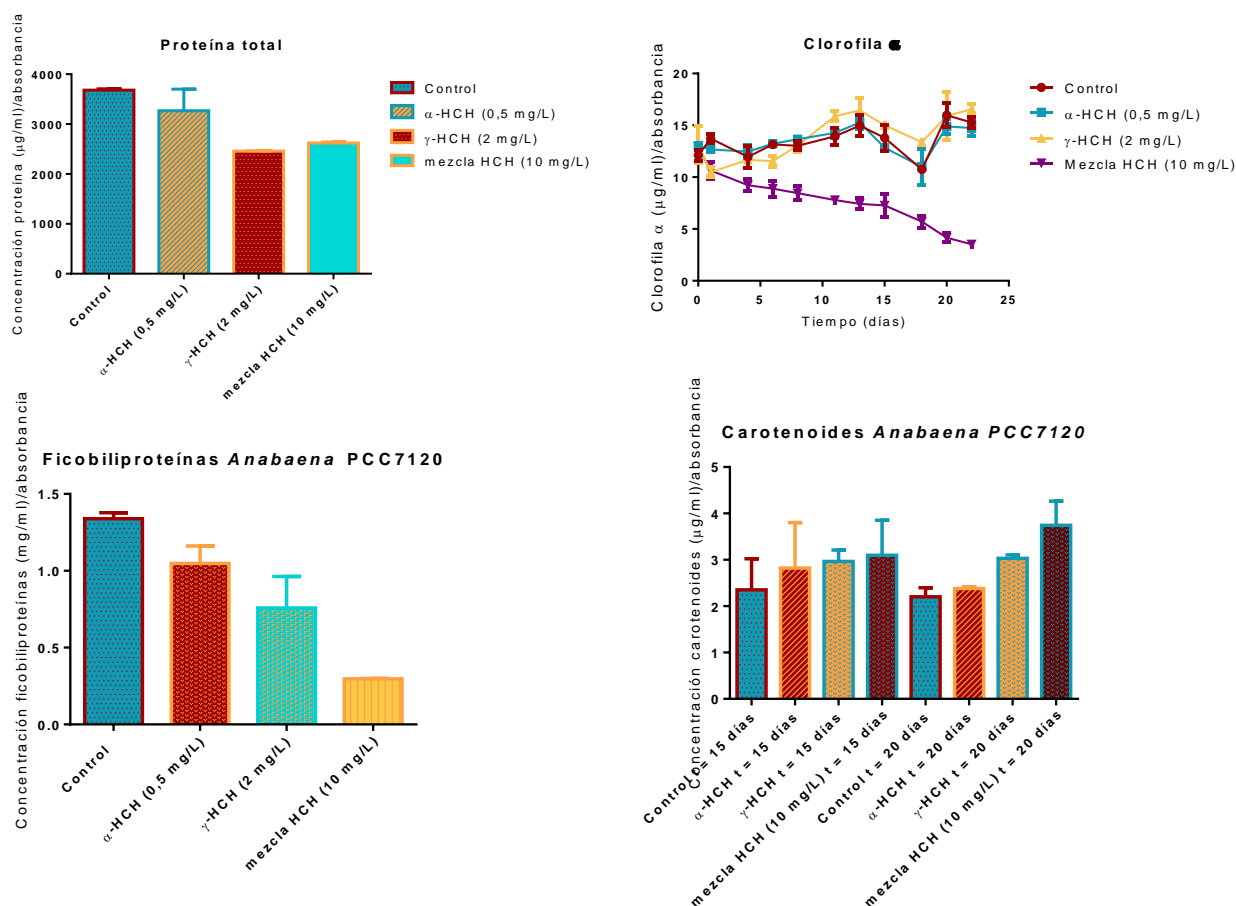
Figura 5: A) Concentración de ficobiliproteínas en presencia de distintos isómeros y mezcla de HCH B) Concentración de carotenoides en presencia de distintos isómeros y mezcla de HCH

En el estudio de la concentración de ficobiliproteínas muestra una disminución significativa en torno al 30% en el caso del α -HCH, del 50% con γ -HCH y del 95% en el caso de la mezcla de isómeros. Estos resultados serían congruentes con la disminución en el contenido de proteína total, ya que se ha estimado que en cianobacterias el contenido en ficobiliproteínas puede

alcanzar hasta el 80% de proteína total de la célula (10). A los 15 días, la concentración de carotenoides en las cianobacterias tratadas con isómero alfa y gamma se mantienen bastante constantes respecto al control sin tratar. En cambio, se aprecia una disminución significativa de la concentración de carotenoides en las muestras tratadas por la mezcla. A los 20 días, sin embargo, se observa un aumento significativo de aproximadamente el 45% en la concentración de carotenoides en la muestra de cultivo con isómero γ -HCH (lindano). Esto podría ser una respuesta al estrés oxidativo que sufre la cianobacteria en presencia de lindano. Además, se aprecia una disminución drástica de la concentración de carotenoides de las muestras tratadas con la mezcla de isómeros de HCH a ambos tiempos.

5.2.1. Normalización de los datos sobre el efecto del α -HCH, γ -HCH (lindano) y mezcla de isómeros de HCHs en *Anabaena* PCC7120

Se llevó a cabo un tratamiento de los datos brutos obtenidos de concentración de proteína total, clorofila *a*, carotenoides y ficobiliproteínas dividiendo estos valores por el valor de absorbancia a 750 nm, que será correlativo al número de células presentes en el cultivo.



Tras la normalización de datos, se observa que tanto la proteína total como las ficobiliproteínas disminuyen al tratarlas con los isómeros α -HCH, γ -HCH y sobre todo con la mezcla de isómeros de HCHs, mientras que la concentración de clorofila *a* en las células se mantiene constante, salvo en el caso de la mezcla de HCHs, donde la cianobacteria está gravemente afectada y manifiesta daños en ambos pigmentos. Por último, los carotenos presentan un aumento de concentración

al tratar *Anabaena* PCC7120 con los isómeros γ -HCH y con la mezcla de isómeros de HCHs a los 20 días de tratamiento. Esto podría considerarse como un mecanismo de defensa ante el estrés oxidativo al que se encuentran expuestas.

5.3. Estudio de la expresión génica mediante PCR a tiempo real

En estudios previos de nuestro laboratorio, se determinaron por alineamiento de secuencias genes homólogos a *linB* y *linE* de *Sphingomonas* en *Anabaena* (10). El gen *linB* codifica para una haloalcano deshalogenasa; y *linE* codifica para una carbonilo reductasa.

Mediante la PCR a tiempo real se estudió la regulación de la expresión de los genes *linB* y *linE*, así como la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y la asimilación de nitrato en cultivos de *Anabaena* sometidos a la presencia de isómeros alfa y gamma. En cuanto a los resultados, tomaremos como significativos los cambios en la expresión cuando éstos superen el umbral ± 1.8 .

5.3.1. Cambios en la expresión de genes en presencia de α -HCH

En este trabajo se analizó en primer lugar la expresión de genes en la cianobacteria *Anabaena* en presencia de α -HCH a tiempos de 1, 5 y 24 horas. Como control se tomó el cultivo de cianobacterias tratado con DMSO, para garantizar que éste no inducía cambios en la expresión. Los resultados se muestran en la Figura 6 y la Figura 7.

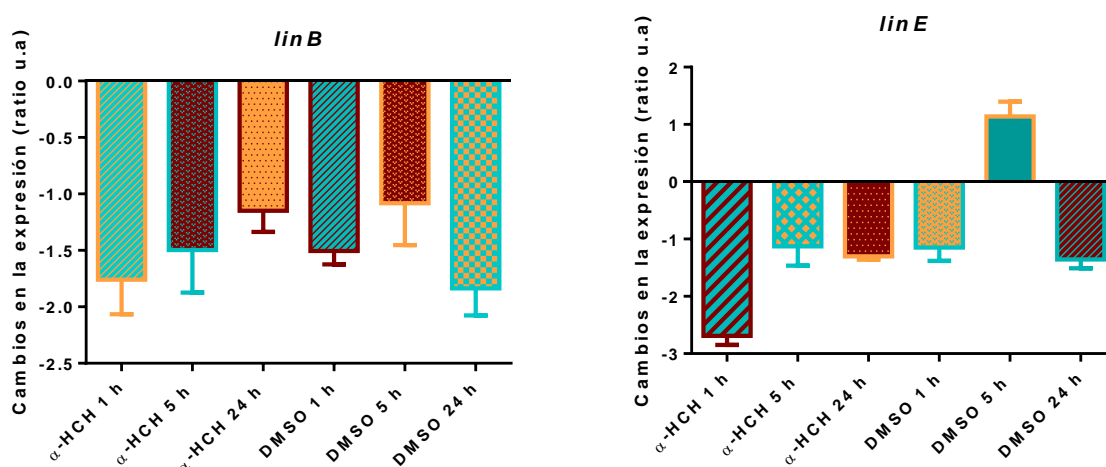


Figura 6: Cambios relativos en los niveles de transcripción de diferentes genes en *Anabaena* PCC7120 como consecuencia a la exposición a 0,5 mg/l de α -HCH. A) Expresión del gen *linB*, B) Expresión del gen *linE*. Los datos se han referido al control sin pesticida a cada tiempo. Los experimentos se llevaron a cabo con dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. Las barras de error representan la desviación estándar.

Analizando la gráfica de expresión del gen *linB* observamos que no hay cambios significativos en la expresión del gen en los tres tiempos estudiados en presencia de α -HCH; y que el DMSO tampoco inducía cambios en la expresión del gen. Analizando los resultados de *linE*, se determinó que el DMSO parece no inducir cambios en la transcripción del gen. Sin embargo, se observó una disminución en la expresión de *linE* (cambio de expresión de 3 veces) tras la primera hora en presencia de α -HCH. Esta disminución en la expresión desapareció tras 5 horas de tratamiento.

Por otro lado, se analizó la expresión de los genes *nirA* y *prxA*, ya que ambos están relacionados con la degradación del lindano por parte de *Anabaena*. El gen *prxA* es un gen de defensa de la cianobacteria ante el estrés oxidativo, mientras que *nirA* es un gen implicado en la asimilación de nitrato; implicado en la degradación de lindano (16). Los resultados se muestran en la Figura 7.

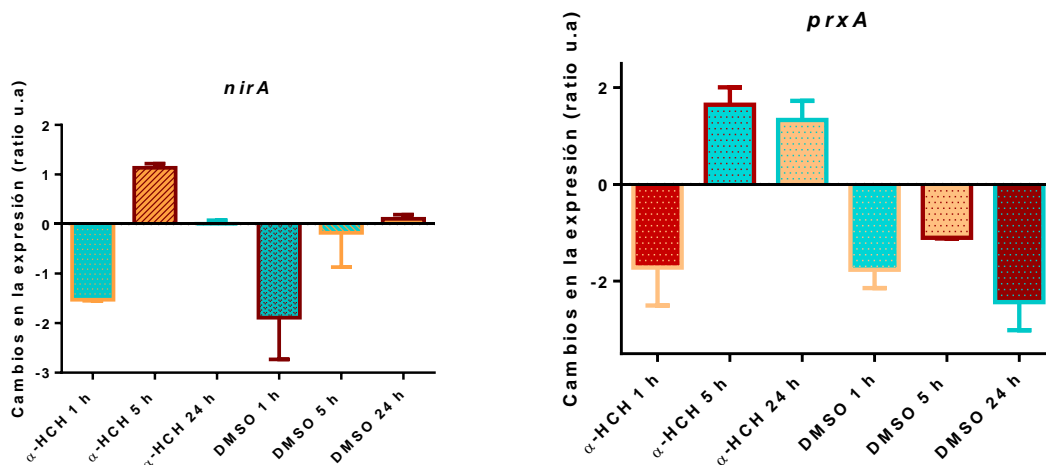
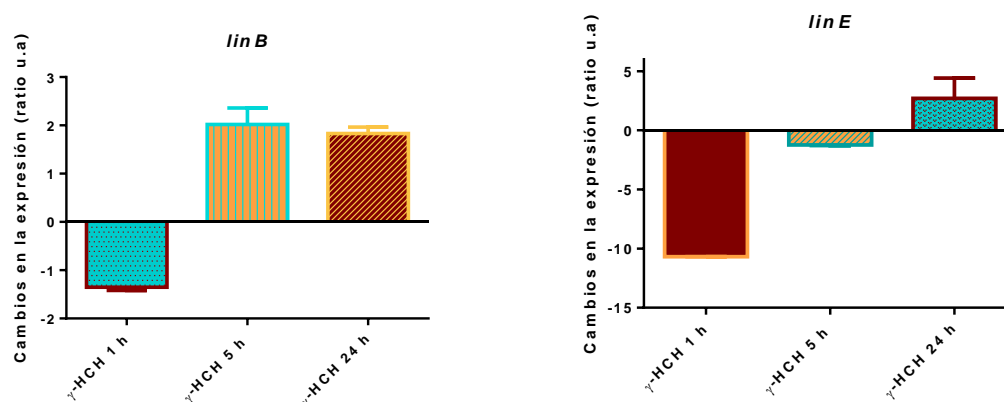


Figura 7: Cambios relativos en los niveles de transcripción de diferentes genes en *Anabaena* PCC7120 como consecuencia a la exposición a 0,5 mg/l de α -HCH. A) Expresión del gen *nirA*, B) Expresión del gen *prxA*. Los datos se han referido al control sin pesticida. Los experimentos se llevaron a cabo con dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. Las barras de error representan la desviación estándar.

La expresión del gen *nirA* no presenta cambios significativos en presencia de α -HCH y tampoco en presencia de DMSO. Sin embargo, el gen *prxA*, presenta un aumento en la expresión de aproximadamente 1.6 veces a las 5 y 24 horas en presencia del isómero α -HCH; y una disminución en su expresión tras 24 horas expuesto al DMSO.

5.3.2. Cambios en la expresión de genes en presencia de γ -HCH (lindano)

A continuación, se estudió el efecto de la presencia del isómero γ -HCH sobre la transcripción de los genes en la cianobacteria *Anabaena*. En primer lugar, se estudiaron los cambios en la expresión de los genes *linB* y *linE*.



Figura

8:

Cambios relativos en los niveles de transcripción de diferentes genes en *Anabaena* PCC7120 como consecuencia a la exposición de 2 mg/l de γ -HCH. A) Expresión del gen *linB*, B) Expresión del gen *linE*. Los

datos se han referido al control sin pesticida. Los experimentos se llevaron a cabo con dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. Las barras de error representan la desviación estándar.

Como se observa en la Figura 8, la expresión del gen *linB* en presencia de lindano experimentó un aumento en su expresión a las 5 horas de aproximadamente 2 veces, que se mantuvo tras 24 horas de exposición al mismo.

Sin embargo, *linE* mostró inicialmente una disminución de 10 veces en su expresión tras 1 hora y finalmente un aumento en su expresión de 2,71 veces a las 24 horas en presencia de γ -HCH.

A continuación, se estudió la expresión de los genes *nirA* y *prxA*. Los resultados se muestran en la Figura 9.

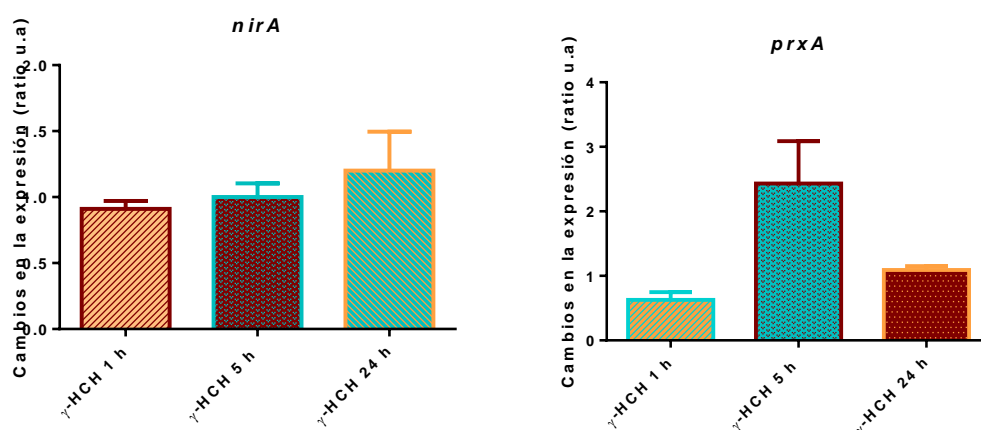


Figura 9: Cambios relativos en los niveles de transcripción de diferentes genes en *Anabaena* PCC7120 como consecuencia a la exposición de 2 mg/l de γ -HCH. A) Expresión del gen *nirA*, B) Expresión del gen *prxA*. Los datos se han referido al control sin pesticida. Las barras de error representan la desviación estándar.

En vista de los resultados, concluimos que no se observan cambios significativos en la expresión del gen *nirA* en presencia de γ -HCH (lindano) a ninguno de los tiempos en los que se estudió la transcripción. Sin embargo, el gen *prxA* sufre un aumento en su expresión de 2.4 veces a las 5 horas de estar expuesto al lindano, como respuesta al estrés oxidativo que sufre la bacteria en presencia del pesticida.

5.4. Estudios de degradación

Se analizó la degradación sufrida por los isómeros alfa y gamma de HCH en presencia de *Anabaena* y la que se podía producir a lo largo del tiempo por fenómenos físicos, como la evaporación. Estos datos tenían una relevancia especial, ya que nos aportaban información acerca de la efectividad de esta cianobacteria en términos de biorremediación, y, además, la confirmación de que no había evaporación permitía adjudicar a las células toda la degradación producida. Los experimentos de degradación se llevaron a cabo como se describe en el apartado 5.4 de Materiales y Métodos. La presencia de isómeros se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de masas. Los resultados se muestran en la Figura 10.

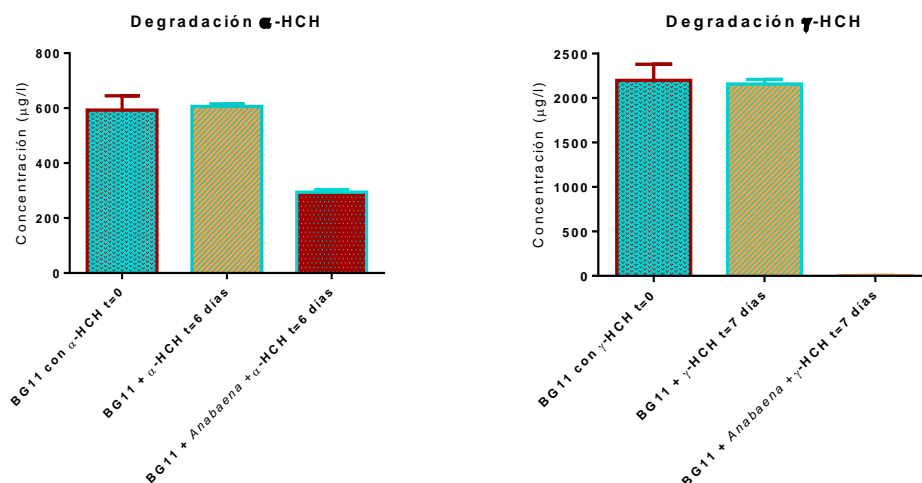


Figura 10: A) Estudio de la degradación de α -HCH por *Anabaena* PCC7120 B) Estudio de la degradación de γ -HCH por *Anabaena* PCC7120. Las barras de error representan la desviación estándar.

Como se observa en la Figura 10, en el caso del isómero α -HCH, *Anabaena* fue capaz de degradar aproximadamente el 50% en menos de una semana. Sin embargo, en el caso del isómero γ -HCH (lindano), la cianobacteria produce una degradación total en menos de una semana. En ambas figuras se observa como en los controles de evaporación/degradación química denominados BG11 con isómero alfa o gamma no se había producido evaporación de los isómeros de HCH, ni degradación no llevada a cabo por las cianobacterias.

5.5. Estudio de tolerancia en placa: aumento de la viabilidad mediante la sobreexpresión de la proteína *furC*

En estudios previos se había observado que la sobreexpresión del gen *furC* aumentaba la tolerancia de la cianobacteria al lindano (γ -HCH) (17). Por ello se analizó el efecto que tenía esta sobreexpresión en la protección de *Anabaena* PCC7120 frente a isómero alfa y la mezcla de isómeros.

Se analizó la respuesta a distintas concentraciones de α -HCH y mezcla de isómeros de HCH de la cepa de cianobacterias *Anabaena* PCC7120 y de una variedad mutante de la cepa que sobreexpresa la proteína FurC.

Se analizó el efecto de concentraciones de α -HCH: 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L y 20 mg/L disuelto en DMSO. También se estudió el posible efecto del DMSO sobre el crecimiento de la cepa silvestre y de la mutante de sobreexpresión de *furC*. Los resultados se muestran en la Figura 10.

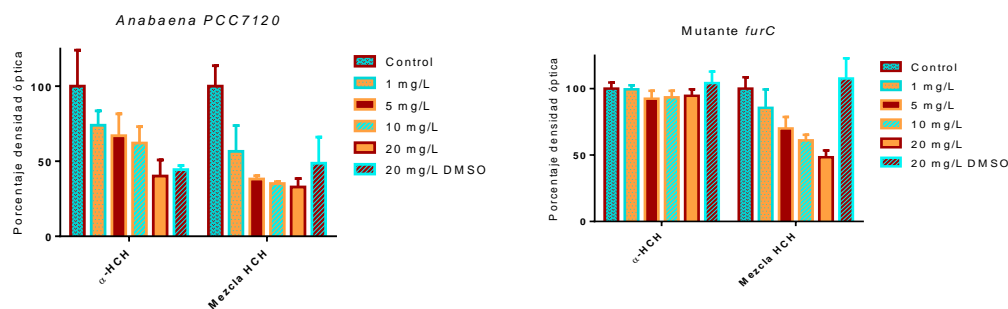


Figura 11: Representación de la tolerancia de *Anabaena* PCC7120 a distintas concentraciones de α -HCH y mezcla de HCHs (gráfico A) y de una cepa mutante de *Anabaena* PCC7120 que sobreexpresa *furC* (gráfico B). Ambas están expresadas en porcentajes referidos a un porcentaje 100% de la muestra control (sin tratar). Las barras de error representan la desviación estándar.

Se observó un notable aumento en la supervivencia de la cepa que sobreexpresa *furC*, en el caso en el que las muestras fueron tratadas con α -HCH. En cambio, cuando se trataron las muestras con la mezcla de isómeros de HCH, se observó que aumenta su tolerancia respecto al silvestre, pero no tanto como cuando tratamos las muestras con el isómero α -HCH a solas.

6. Discusión

6.1. Tolerancia de *Anabaena* PCC7120 a γ -HCH (lindano), α -HCH y mezcla de isómeros de HCHs

La cianobacteria *Anabaena* PCC7120 no presentó alternaciones en el crecimiento ni en el contenido en clorofila en presencia de 2 mg/l de lindano. Sin embargo, tras su exposición al pesticida, presentó una disminución en la cantidad tanto de proteína total como de ficobiliproteínas. El cambio en ambos parámetros es congruente con el hecho de que se ha descrito que en *Anabaena* el contenido en ficobiliproteínas puede alcanzar hasta un 80% del contenido total de las proteínas presentes en la célula (10).

En cuanto al contenido en carotenoides, se observó un aumento en el contenido de los mismos en presencia de lindano. El aumento de los carotenoides podría deberse al estrés oxidativo generado por la presencia de HCHs ya que éstos ejercen un papel protector en la célula ante estas situaciones. Estudios previos indicaron que la presencia de lindano puede inducir la expresión de enzimas de respuesta a estrés oxidativo (10).

Anabaena PCC7120 tampoco presentó una afectación significativa del crecimiento ni del contenido en clorofila en presencia del isómero alfa a una concentración de 0.5 mg/l. Por otro lado, se apreció un descenso en la cantidad de proteína total y ficobiliproteínas. Sin embargo, este descenso fue menor que en el caso del tratamiento de las células con isómero gamma. Este hecho podría estar relacionado con que la concentración final disuelta del isómero alfa (0.5 mg/l) era 4 veces inferior a la del isómero gamma (2mg/l).

Finalmente, *Anabaena* mostró una drástica afectación en el crecimiento, en la concentración de proteína total, en el contenido en clorofila α , ficobiliproteínas y carotenoides cuando se sometió a un tratamiento con mezcla de isómeros de HCHs (33.1% de α -HCH, 2.3% de β -HCH, 5.9% de γ -HCH, 3.3% de δ -HCH y 0.8% de ϵ -HCH).

Se ha descrito en la bibliografía que la presencia del isómero δ -HCH afecta gravemente a la viabilidad de las células de *Sphingomonas*, ya que su degradación parcial genera la aparición de un metabolito tóxico para las células (19). En vista de los resultados previos, se podría sugerir que la presencia de este isómero es lo que hace que las células de *Anabaena* mueran en presencia de la mezcla de isómeros, aunque no se pueden descartar otras causas. En el futuro se van a realizar curvas de crecimiento con los distintos isómeros por separado para verificar que la muerte de las células es producida por la presencia del isómero δ -HCH.

6.2. Capacidad de degradación de isómeros α -HCH y γ -HCH por parte de la cianobacteria *Anabaena* PCC7120

En este trabajo se ha evaluado la capacidad de *Anabaena* PCC7120 de degradar isómero gamma e isómero alfa a unas concentraciones finales de 2 mg/l y 0.5 mg/l, respectivamente. Lo que se observó fue que la cianobacteria era capaz de degradar un 50% el isómero alfa en una semana. Además, *Anabaena* PCC7120 degradó el lindano casi totalmente en menos de una semana.

Respecto al hecho de que la cianobacteria degrade más lentamente el isómero alfa que el gamma es congruente con la biodegradabilidad de los mismos ya que se ha descrito previamente que el isómero alfa es menos biodegradable que el isómero gamma (7).

Tanto el isómero alfa como el gamma son los isómeros más habitualmente presentes en los lugares contaminados con lindano. Tanto la tolerancia a la presencia de estos isómeros como la degradación de los mismos abre la puerta a una potencial aplicación de esta cianobacteria en la biorremediación de ambos compuestos. Sin embargo, en el caso de que se compruebe que la muerte de las células se produce realmente por la presencia de isómero delta, se debería monitorizar la presencia de dicho isómero para garantizar la viabilidad de las células.

Finalmente, se ha de tener en cuenta que los datos obtenidos son resultado del estudio de degradación de isómero alfa y gamma por parte de *Anabaena* PCC7120 a una concentración determinada de isómero y a un solo tiempo. En el futuro, se van a repetir estos experimentos con distintas concentraciones de los isómeros y realizando curvas de degradación, tomando datos a distintos tiempos para ser capaces de determinar cuánto tiempo utiliza la cianobacteria en degradar el 100% del isómero o si a tiempos mayores, *Anabaena* puede llegar a degradar el isómero alfa totalmente. Además, se llevarán a cabo también curvas de degradación tanto con la mezcla de isómeros de HCHs como con los isómeros comerciales por separado.

6.3. Expresión génica

En este estudio se ha determinado que la expresión de los genes *linB* y *linE* en *Anabaena* PCC7120 se induce ligeramente (2 veces en el caso de *linB* y 2,7 veces en el caso de *linE*) en presencia de lindano. Estos datos indicarían que ambos genes serían inducibles. Este hecho constituiría una diferencia notable con la expresión de estos genes en *Sphingomonas*, ya que en esta bacteria la expresión del gen *linB* es constitutiva mientras que la de *linE* es inducible (20).

En cuanto a los tiempos de inducción se observó que el gen *linB* se induce a tiempo 5 h y se mantiene su expresión hasta las 24 horas, mientras que el gen *linE* se induce a tiempo 24h. El enzima que está codificado en el gen *linB* es una haloalcano deshalogenasa. Esta enzima actuaría en la ruta de degradación en primer lugar, con lo que la expresión temprana de este gen concordaría con este hecho. Además, en *Sphingomonas* se ha descrito que *linE* se induce por la

presencia de un intermediario metabólico de la degradación de lindano, por lo tanto, la expresión más tardía del gen *linE* que codifica para la oxigenasa de escisión de anillo también concordaría con esta observación.

El gen *prxA*, que pertenece a la familia de las peroxiredoxinas, es una peroxidasa tiol-específica que cataliza la reducción de H_2O_2 , alquilhidroperóxidos y peroxinitritos (21). La expresión de este gen se mantuvo constante en presencia del isómero alfa en los tiempos de estudio, mientras que se vio ligeramente aumentada con el isómero gamma a las 5 horas, como se había visto en estudios anteriores (10). El aumento de la expresión de *prxA* se podría deber probablemente a que los isómeros de HCHs están generando estrés oxidativo a la cianobacteria y esta responde expresando estas enzimas que le permiten sobrevivir a este tipo de situaciones.

Por otra parte, los genes del metabolismo del nitrógeno están estrechamente ligados a la ruta de degradación del lindano en *Anabaena* (14). Sin embargo, en el presente trabajo se observó que la expresión de estos genes permanece constante en presencia del isómero alfa y gamma.

7. Conclusiones

A la vista de los resultados de todos los experimentos llevados a cabo a lo largo del estudio, se pudo concluir que:

- El crecimiento de *Anabaena* PCC7120 y el contenido en clorofila *a* no se vieron afectados en presencia de los isómeros alfa y gamma pero sí en presencia de la mezcla de isómeros. Este cambio se podría asociar a la presencia del isómero delta, cuya degradación parcial genera un metabolito intermedio tóxico para otras bacterias como *Sphingomonas*.
- *Anabaena* PCC7120 fue capaz de degradar prácticamente la totalidad del isómero gamma (lindano) tras una semana para las concentraciones estudiadas; y el 50% del isómero alfa en el mismo tiempo.
- Los genes *linB* y *linE* de *Anabaena* PCC7120, potencialmente implicados en la ruta de degradación de la cianobacteria presentaron una inducción en presencia del isómero gamma pero no en presencia del isómero alfa. El gen *nirA*, relacionado con la asimilación de nitrato, no presentó cambios significativos en presencia de los isómeros alfa y gamma. Sin embargo, el gen *prxA*, relacionado con el estrés oxidativo, presentó una inducción en presencia de ambos isómeros.



8. Bibliografía

Referencias

1. *Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs—a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers*. Weber, John Vijgen & P. C. Abhilash & Yi Fan Li & Rup Lal & Martin Forter & Joao Torres & Nandita Singh & Mohammad Yunus & Chongguo Tian & Andreas Schäffer & Roland. 2010.
2. *Comparative Metagenomic Analysis of Soil Microbial Communities across Three Hexachlorocyclohexane Contamination Levels*. Naseer Sangwan, Pushp Lata, Vatsala Dwivedi, Amit Singh, Neha Niharika, Jasvinder Kaur, Shailly Anand, Jaya Malhotra, Swati Jindal, Aeshna Nigam, Devi Lal, Ankita Dua, Anjali Saxena, Rajagopal Raman, Paramjit Khurana, Jitendra P. Khurana, Rup Lal. 2012.
3. *Plan estratégico de lucha integral contra la contaminación de los residuos generados por la fabricación de lindano en Aragón*. Aragón, Gobierno de. 2016.
4. *POP-contaminated sites from HCH production in Sabiñánigo, Spain*. Cacho, J. Fernández & M. A. Arjol & C. 2013.
5. *Engineering bacteria for bioremediation of persistent organochlorine pesticide lindane (??-hexachlorocyclohexane)*. Chaurasia, A. K., Adhya, T.K., & Apte, S. K. 2013.
6. *Lindane toxicity: a comprehensive review of the medical literature*. Nolan K, K. J., Levitt J. 2012.
7. *Distribution and phylogeny of hexachlorocyclohexane-degrading bacteria in soils from Spain*. William W. Mohn, Birgit Mertens, Josh D. Neufeld, Willy Verstraete and Victor de Lorenzo. 2006.
8. *Isolation and identification of an aerobic gamma-HCH-descomposing bacterium from soil*. Wada, Keishi Senoo & Hidenori. 1989.
9. *Enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) in contaminated soils via inoculation with *Sphingobium indicum* B90A*. Vishakha Raina, Mrutyunjay Suar, Ajaib Singh, Om Prakash, Mandeep Dadhwal, Sanjay Kumar Gupta, Charu Dogra, Kirsten Lawlor Sukanya Lal, Jan Roelof van der Meer, Christof Holliger, Rup Lal. 2008.
10. *Study of the response to γ -lindane in cyanobacteria: transcriptional changes of genes potentially involved*. Carolina Castro, Emma Sevilla, Maria Luisa Peleato. 2016 : s.n.
11. *Identification and characterization of genes involved in the downstream degradation pathway of gamma-hexachlorocyclohexane in *Sphingomonas paucimobilis* UT26*. Endo, R., Kamakura, M., Miyauchi, K., Ohtsubo, Y., Tsuda, M., Fukuda, M., & Nagata, Y. 2005.
12. *Aerobic degradation of lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis*. Yugi Nagata, Ryo Endo, Michihiro Ito, Yoshiyuki Ohtsubo & Masataka Tsuda. 2007.
13. *Cyanobacteria as agents for the control of pollution by pesticides and chlorinated organic compounds*. Kuritz, T. 1998.
14. *Dechlorination of lindane by the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120 depends on the function of the nir operon*. Kuritz, T., Bocanera, L. V.m & Rivera, N. S. 1997.



15. *New insights into the role of Fur proteins: FurB (Al2473) from Anabaena protects DNA and increases cell survival under oxidative stress.* López, S. O., Sevilla, E., Bes, T., Peleato, M. L., Fillat, M., 2009.
16. *Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic pollutants.* T. Kuritz, P. W. 1995.
17. *Rol de FurC en Anabaena sp. PCC 7120.* Esther Broset, Maria Fillat. 2012.
18. *Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria.* Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., & Stanier, R. Y. 1979 : s.n.
19. *Dynamics of Multiple lin Gene Expression in Sphingomonas paucimobilis B90A in Response to Different Hexachlorocyclohexane Isomers.* Mrutyunjay Suar, Jan Roelof van der Meer, Kirsten Lawlor, Christof Holliger and Rup Lal. 2004.
20. —.Mrutyunjay Suar, Jan Roelof van der Meer, Kirsten Lawlor, Christof Holliger, and Rup Lal. 2004.
21. *A eukaryotic-like sulfiredoxin involved in oxidative stress responses and in reduction of the sulfinic form of 2-Cys peroxiredoxin in the cyanobacterium Anabaena PCC7120.* Boileau, C., Eme, L., Brochier-Armanet, C., Janicki, A., Zhang, C.C., Latifi, A. 2011.
22. *Aerobic degradation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis.* Tsuda, Yuji Nagata & Ryo Endo & Michihiro Ito & Yoshiyuki Ohtsubo & Masataka. 2007.

9. Material suplementario

9.1. Ruta de degradación en *Spingomonas paucimobilis*

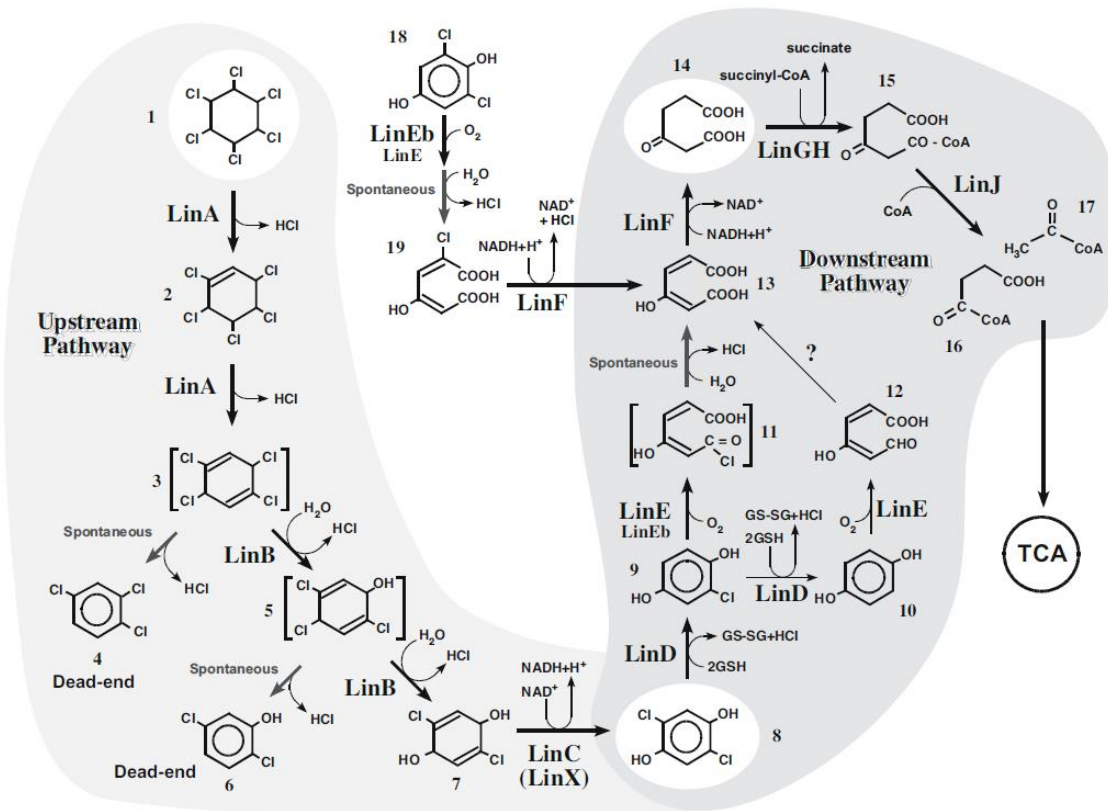


Figura 1: Ruta de degradación del lindano en *Spingomonas paucimobilis* (22)

9.2. Programa de la PCR a tiempo real y procedimiento matemático utilizado para determinar el cambio en la expresión génica

			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

Tabla 1. Programa mediante el cual se llevó a cabo la Real Time PCR.

La variación de 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 que se ha producido en la expresión de los genes de estudio. Los cálculos realizados fueron los siguientes:

- Se calculó la media de las réplicas técnicas.



- Se calculó $\Delta CT = (CT \text{ salvaje} - CT \text{ housekeeping})$
- Se calculó $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ muestra (lindano o DMSO)} - \Delta CT \text{ muestra control}$
- Se obtuvo la variación de la expresión del gen, expresado como Foldchange, calculado como $2^{-\Delta\Delta CT}$. Si el valor obtenido es menor que uno, se calcula el inverso y se cambia de signo.
- Los cambios en la expresión génica se representan gráficamente mediante la media del Foldchange y su desviación estándar.

Los genes de *Anabaena* cuya expresión cuantificamos fueron *linB*, *linE*, *nirA* y *prxA*. Como “housekeeping” se utilizó *rpnB*.

9.3. Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR a tiempo real

CEBADOR	SECUENCIAS 5' → 3'	SECUENCIA AMPLIFICADA
<i>rpnB for</i>	AGCGGAAGTGGTAAAAGACCAA	Gen <i>rpnB</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
<i>rpnB rev</i>	GAGAGGTACTGGCTCGGTAAACC	Gen <i>rpnB</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
<i>prxA for</i>	CCATCACCTACGGAACACAAGA	Gen <i>prxA</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
<i>prxA rev</i>	TCCTGATCAACTACAGCTGTTGCT	Gen <i>prxA</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
<i>linB for</i>	CGATCGCACTCTCAAAGCTATAATC	Gen <i>linB</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
<i>linB rev</i>	TCACATAGTAGCGCCAGATATGC	Gen <i>linB</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
<i>linE for</i>	ACTTCGCATCTCTGCAAAAA	Gen <i>linE</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
<i>linE rev</i>	CAGCCGTCTATTTGGCAACA	Gen <i>linE</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
<i>nirA for</i>	TCTTTGGGATGGGAAGCAAT	Gen <i>nirA</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
<i>nirA rev</i>	GAAAGAATACCCACCCATTG	Gen <i>nirA</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120

Tabla 2: Cebadores utilizados para llevar a cabo la RT-PCR, obtenidos con el programa PrimeExpress3.3 (AppliedBiosystems).