

Caracterización de la cianobacteria *Anabaena* PCC7120 como potencial biorremediador de lindano: respuesta fisiológica y transcripcional y aplicación a muestras de campo

Sara Abizanda Campo

Curso 2017/18

• Máster en Biología Molecular y Celular • Universidad de Zaragoza •



Universidad Zaragoza

• Trabajo de Fin de Máster •

“Caracterización de la cianobacteria *Anabaena* PCC7120 como potencial biorremediador de lindano: respuesta fisiológica y transcripcional y aplicación a muestras de campo”.

“Characterization of the cyanobacteria *Anabaena* PCC7120 as a potential lindane biorremediator: physiological and transcriptional response and application to field samples”.

Proyecto de Fin de Máster en Biotecnología dirigido por:

Emma Sevilla Miguel y Jesús Fernández Cascán

Alumna: Sara Abizanda Campo

Curso 2017/18



Índice

1.	Resumen/Abstract	1
1.1.	Resumen	1
1.2.	Abstract.....	1
2.	Introducción.....	2
2.1.	El lindano: un problema global	2
2.2.	El lindano en Sabiñánigo (Huesca)	5
2.2.1.	El vertedero de Sardas	6
2.2.2.	El vertedero de Bailín	7
2.2.3.	Situación y acción actual frente a la contaminación por residuos de la fabricación del lindano en Sabiñánigo	8
2.3.	Degradación del lindano e isómeros de HCH por microorganismos	9
2.3.1.	Ruta de degradación del lindano en bacterias y cianobacterias.....	10
2.4.	Efectos fisiológicos de la presencia de lindano en <i>Anabaena PCC7120</i>	12
2.5.	Estrés oxidativo en cianobacterias	13
2.6.	Defensas a estrés oxidativo de <i>Anabaena PCC7120</i>	14
3.	Objetivos	16
4.	Materiales y métodos.....	17
4.1.	Cepas y medios de cultivo	17
4.1.1.	Cultivo en un medio líquido	17
4.1.2.	Cultivos para el estudio de la expresión génica	17
4.1.3.	Preparación de perlas de alginato de <i>Anabaena PCC7120</i>	18
4.1.4.	Estudios de la degradación de isómeros por <i>Anabaena PCC7120</i> en perlas de alginato	18
4.2.	Aislamiento y análisis de RNA de <i>Anabaena PCC7120</i>	19
4.2.1.	Toma de muestras de RNA de <i>Anabaena PCC7120</i>	19
4.2.2.	Extracción del RNA y tratamiento con DNase I del RNA de <i>Anabaena PCC7120</i>	20



4.2.3.	Electroforesis del RNA de <i>Anabaena</i> PCC7120	21
4.2.4.	Cuantificación del RNA de <i>Anabaena</i> PCC7120.....	21
4.2.5.	Comprobación de la pureza del RNA aislado de <i>Anabaena</i> PCC7120	21
4.2.6.	Retrotranscripción del RNA de <i>Anabaena</i> PCC7120	22
4.3.	Estudio de expresión génica mediante PCR a tiempo real	23
4.3.1.	Estudio de la amplificación de fragmentos de genes de interés	23
4.4.	Técnicas de trabajo con DNA.....	23
4.4.1.	Aislamiento del DNA total a partir de muestras de campo	23
4.5.	Técnicas analíticas de proteínas	24
4.5.1.	Cuantificación de proteínas	24
4.5.2.	Electroforesis de proteínas	25
4.6.	Técnicas inmunoquímicas	26
4.6.1.	Transferencia de proteínas a membranas: Western Blot	26
4.6.2.	Detección específica mediante anticuerpos de proteínas en filtros: Western Blot	27
4.7.	Determinación de actividades enzimáticas de extracto crudo de <i>Anabaena</i> PCC7120	28
4.7.1.	Determinación de la actividad catalasa de un extracto celular	28
4.7.2.	Determinación de la actividad superóxido dismutasa en un extracto celular	29
4.7.3.	Medida de la actividad diaforasa de la FNR de <i>Anabaena</i> PCC7120 en un extracto celular	31
4.8.	Otras técnicas analíticas.....	32
4.8.1.	Medidas con el electrodo de oxígeno de tipo Clark.....	32
5.	Resultados	33
5.1.	Respuesta morfológica y fisiológica de <i>Anabaena</i> PCC7120 a la presencia de γ-HCH.....	33
5.1.1.	Estudio de la afectación morfológica de las células de <i>Anabaena</i> PCC7120 en presencia de γ-HCH.....	33
5.1.2.	Fotosíntesis y Respiración de <i>Anabaena</i> PCC7120 en presencia de γ-HCH	35



5.1.3. Efecto del γ -HCH sobre enzimas implicadas en la defensa al estrés oxidativo de <i>Anabaena</i> PCC7120.....	36
5.1.3.1. Determinación de actividades enzimáticas en extractos crudos de <i>Anabaena</i>	37
5.1.3.2. Estudio de la expresión génica de proteínas implicadas en la defensa al estrés oxidativo: FurA, FurB y flavodoxina mediante Western Blot	40
5.2. Respuesta transcripcional de <i>Anabaena</i> PCC7120 a la presencia de γ -HCH	41
5.2.1. Estudio de la expresión génica de genes implicados en la defensa al estrés oxidativo en <i>Anabaena</i> PCC7120.....	41
5.2.2. Estudio de la expresión génica de genes potencialmente implicados en la ruta de degradación de γ -HCH de <i>Anabaena</i> PCC7120.....	43
5.3. Aplicación a muestras de campo	45
5.3.1. Estudio de la presencia de genes <i>linBy</i> <i>linE</i> en muestras de campo procedentes de Bailín y Sardas	45
5.3.2. Estudio de la conservación de los cebadores para la amplificación de los genes <i>linBy</i> <i>linE</i> en muestras de campo	46
5.3.3. Estudio de la presencia de genes <i>linBy</i> <i>linE</i> en muestras procedentes de Bailín y Sardas	48
5.4. Estudios de degradación	50
6. Discusión de resultados.....	53
6.1. <i>Anabaena</i> PCC 7120 muestra cambios morfológicos y un fenotipo de respuesta a estrés oxidativo en presencia de lindano	53
6.2. La expresión de los genes <i>linBy</i> <i>linE</i> no se ve inducida ni a tiempos cortos ni a tiempos largos de análisis.....	55
6.3. Aplicación de <i>Anabaena</i> PCC7120 a muestras de vertederos de HCH.....	55
6.3.1. Determinación de la presencia de genes <i>lin</i>	55
6.3.2. Degradación de lindano de <i>Anabaena</i> PCC7120 inmovilizada en perlas de alginato	56
7. Conclusiones	57
Referencias	58



Tabla de abreviaturas

- HCH: Hexaclorociclohexano
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- SOD: Superóxido dismutasa
- SDS: Dodecilsulfato sódico
- PSA: Persulfato de amonio
- TEMED: Tetrametiletilendiamina
- PVDF: Difluoruro de polivinilideno
- TBST: Solución salina tamponada con tris (TBS)+Tween 20
- NBT: Cloruro de nitroblue tetrazolium
- DCPIP: 2,6 diclorofenol-indofenol
- FNR: Ferredoxina NADP⁺ reductasa



1. Resumen/Abstract

1.1. Resumen

La contaminación por hexaclorociclohexanos (HCH) constituye un problema de salud ambiental a escala mundial. Uno de los lugares más contaminados está en el Pirineo aragonés, en el municipio de Sabiñánigo (Huesca). La degradación de estos compuestos por microorganismos se plantea como una posible solución al problema, debido a que se han descrito cepas capaces de degradar el compuesto. Una de ellas es *Anabaena PCC7120*, que es capaz de degradar al menos el isómero γ -HCH (lindano). En este trabajo se ha caracterizado fisiológicamente la respuesta del microorganismo a la presencia del lindano mediante el estudio de la afectación morfológica de sus células, la tasa de fotosíntesis y respiración y su respuesta a estrés oxidativo. Se han determinado para ello la variación en la expresión de algunas actividades enzimáticas de respuesta a estrés oxidativo además de las inducción de proteínas Fur y flavodoxina. Se ha observado un aumento en la actividad catalasa y una disminución en la actividad diaforasa de la proteína FNR, además de una sobreexpresión de las proteínas FurA y FurB, ambas asociadas a la presencia de estrés oxidativo. Por otro lado, se ha estudiado la inducción de la expresión de los genes *lin* potencialmente implicados en la ruta de degradación de lindano y se ha evaluado la tasa de degradación utilizando un método de inmovilización basado en perlas de alginato. Se concluye que *Anabaena PCC7120* inmovilizada en perlas de alginato es capaz de degradar un 60% del lindano en 6 días. En último lugar, se ha puesto a punto un método para detectar la presencia de los genes *lin* en muestras de agua potencialmente contaminada con lindano.

1.2. Abstract

Pollution by hexachlorocyclohexanes (HCH) constitutes a problem of global environmental health which presents one of its most contaminated points in Sabiñánigo (Huesca).



The degradation of these compounds by microorganisms has been proposed as a potential solution to the problem, due to the fact that some strains have been described as capable of degrading it. One of them is *Anabaena* PCC7120, which is able to degrade at least the γ -HCH isomer (lindane).

In this work, the response of the microorganism to the presence of lindane was physiologically characterized by the study of the morphological affectation of the cells, the rate of photosynthesis and respiration and the response to oxidative stress that is generated by pesticide. It was also determined the variation in the expression of some enzymatic activities in response to oxidative stress, in addition to Fur and flavodoxin proteins. An increase in catalase activity and a decrease in the diaphorase activity of FNR protein was observed, in addition to an overexpression of the FurA and FurB proteins, both associated with the presence of oxidative stress. The induction of *lin* genes which are potentially involved in the lindane degradation pathway of this cyanobacterium was analysed. Furthermore, the degradation rate of *Anabaena* PPC7120 immobilized in alginate beads was determined, obtaining that *Anabaena* PCC7120 is capable of degrading 60% of the compound in 6 days. Finally, a method to detect the presence of *lin* genes in samples of lindane-contaminated water was developed.

2. Introducción

2.1. El lindano: un problema global

Desde 1930 hasta 1990 el hexaclorociclohexano técnico (HCH técnico) y el lindano (γ -HCH) han sido dos de los pesticidas organoclorados más ampliamente utilizados en todo el mundo. El uso de estos dos compuestos durante casi seis décadas ha tenido como resultado un problema de contaminación medioambiental de dimensiones globales (Li, 1999).

El lindano se produce mediante cloración fotoquímica del benceno. En este proceso se obtiene como producto intermedio el HCH técnico. Este producto intermedio contiene ocho isómeros del hexaclorociclohexano denominados desde α -HCH hasta θ -HCH, en función del 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 %, y ϵ 3-4 % (Naseer Sangwan, 2012). La Figura 1 muestra un esquema del proceso de fabricación del lindano.

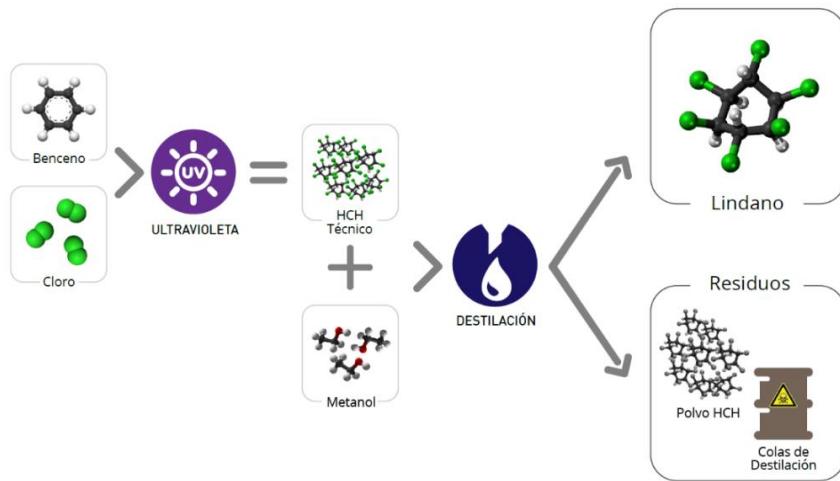


Figura 1: Esquema del proceso de producción del lindano (Plan estratégico de lucha integral contra la contaminación de los residuos generados por la fabricación de lindano en Aragón; Gobierno de Aragón, diciembre 2016).

Entre 1940 y 1950, el HCH técnico fue utilizado como insecticida, sin embargo, pronto se descubrió que solamente el isómero gamma (lindano) tenía propiedades insecticidas (Walker, 1999), además de ser el isómero más biodegradable y menos persistente (van der Meer et al, 2004). A partir de la década de 1950 comenzó a aislar industrialmente el lindano con una pureza cercana al 99% (Willet, 1998). La producción de 1 tonelada de lindano, generaba aproximadamente entre 8 y 12 toneladas de los demás isómeros del HCH (Fang, 2015).

Se estima que la cantidad mundial de lindano utilizado en agricultura fue aproximadamente de 435.500 toneladas, a las cuales se corresponden una cantidad 10 veces mayor de residuos halogenados producidos en el proceso de fabricación (Schäffer & Weber, 2011). Durante todo este tiempo, los residuos de la producción de lindano fueron almacenados de forma incontrolada, generando un grave problema de salud tanto ambiental como humana (PANNA, 2008). Así, estos lugares de almacenamiento incontrolado representan puntos calientes de contaminación por estos compuestos organoclorados a

nivel mundial (Schäffer & Weber, 2011). Estimaciones realizadas por distintos estudios sitúan la cantidad de residuos de HCH almacenados globalmente entre los 5 y los 7 millones de toneladas (Bodenstein, 1972; Krum, 1982; Treger, 2004). La distribución estimada de los mismos se muestra en la Figura 2.

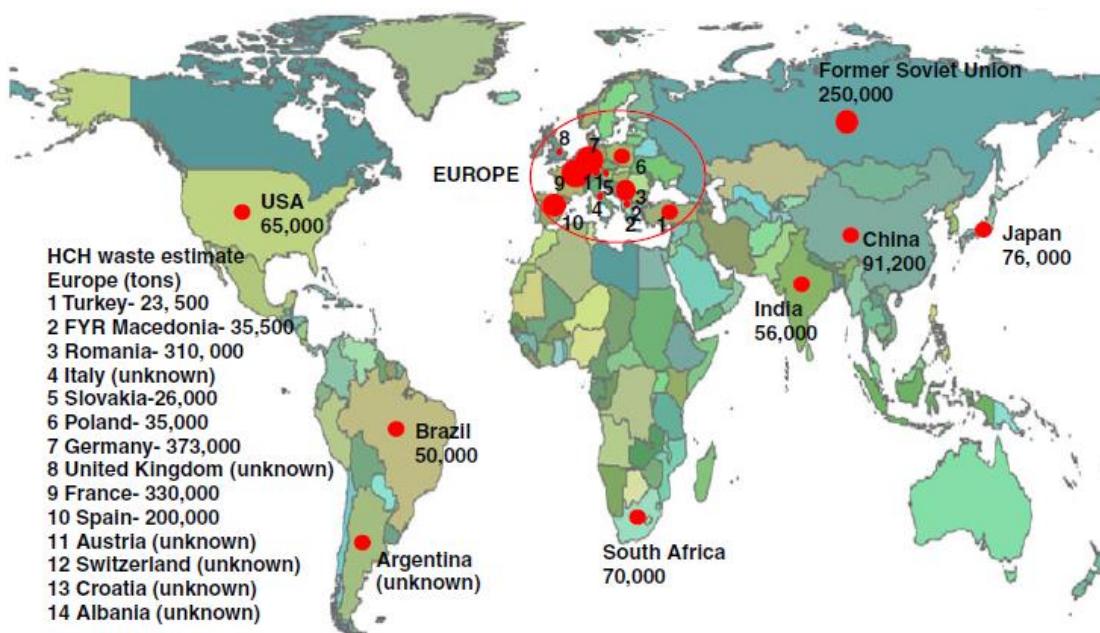


Figura 2: estimación de la cantidad y localización de residuos de HCH almacenados globalmente (Vijgen et al., 2010).

En noviembre de 2006 se prohibió el lindano en todas sus formulaciones y usos en más de 52 países por su peligrosidad para la salud humana y el medio ambiente (Weber, 2011), mientras que en otros 33 se restringió su utilización. Sin embargo, en otros 17 países, incluyendo Estados Unidos y Canadá se continuó permitiendo su uso limitado en agricultura o farmacia (tratamiento de escabiosis y pediculosis) (Commission for Environmental Cooperation. North American Regional Action Plan, 2006).

En 2009, el lindano (γ -HCH) y sus isómeros α -HCH y β -HCH fueron incluidos en la lista de Contaminantes Orgánicos Persistentes (POPs: Persistent Organic Pollutants) de la Convención de Estocolmo (Fernandez et al, 2013). Desde 2015, el lindano está oficialmente incluido en la lista de



agentes cancerígenos para el ser humano de la OMS, dentro del Grupo 1, la categoría de más alto riesgo (Levitt, 2012).

2.2. El lindano en Sabiñánigo (Huesca)

En España se cesó la producción de lindano en 1988. Hasta ese momento, se produjo en cuatro plantas diferentes: dos de ellas se localizaban en el País Vasco y generaron entre las dos aproximadamente 82000 toneladas de residuos de producción de lindano. La tercera se encontraba en Galicia y generó varios cientos de toneladas de desechos halogenados y la última de ellas, en Sabiñánigo (Pirineo de Huesca), generó aproximadamente 115000 toneladas de residuos de HCH (Fernandez et al., 2013).

Entre 1975 y 1989 la fábrica de Industrias Químicas del Noroeste SA, más conocida como Inquinosa, fabricó en la localidad de Sabiñánigo grandes cantidades de lindano. La actividad industrial de la empresa Inquinosa durante más de 15 años en esta zona del Pirineo Aragonés ha generado más de 115,000 toneladas de residuos de alto contenido en HCH y otros compuestos organoclorados (Navarro, 2013). Estos residuos se depositaron de forma incontrolada y sin ningún tipo de impermeabilización del terreno en el vertedero de Sardas y posteriormente en el de Bailín. Esto ha generado un problema de contaminación muy grave que ha convertido su eliminación en un auténtico reto medioambiental debido a la naturaleza tóxica, cancerígena, bioacumulable, biomagnificable y persistente de los contaminantes; la contaminación multicomponente y multiafección; el gran volumen de los residuos; la presencia de una fase libre densa organoclorada (DNAPL), la geología compleja y desfavorable de la zona y la proximidad de los vertederos al casco urbano de Sabiñánigo y al río Gállego (afluente del Ebro de 200 km de longitud, con una cuenca de 4,020 km² de superficie y una gran diversidad ecológica, además de embalses a lo largo de su recorrido) y con consumo humano aguas abajo. Además, el 60% de la superficie de la cuenca del río tiene uso agrícola (Diputación general de Aragón, 2016).

2.2.1. El vertedero de Sardas

Se encuentra a menos de 1 km del centro urbano de Sabiñánigo y ocupa una superficie de unas 4 ha junto al río Gállego. Históricamente, se han vertido distintos tipos de residuos, incluyendo residuos de la producción del lindano y de otras industrias químicas, entre ellos residuos sólidos y líquidos de HCH, mercurio, sosa, hipoclorito, dicromatos, ditiocarbamatos, residuos sólidos urbanos, residuos de construcción y demolición, etc. Se estima que contenía entre 50000 y 80000 m³ de residuos de isómeros de HCH en forma de polvo y 3000 m³ en forma líquida (DNAPL). Actualmente solo quedan unos 30 m³ en forma densa. Presenta una contaminación de suelos, aguas superficiales y aguas subterráneas.

Tras la colmatación de Sardas, se comenzó a utilizar el vertedero de Bailín para almacenar los residuos generados por la producción de lindano (Fernandez et al., 2013).

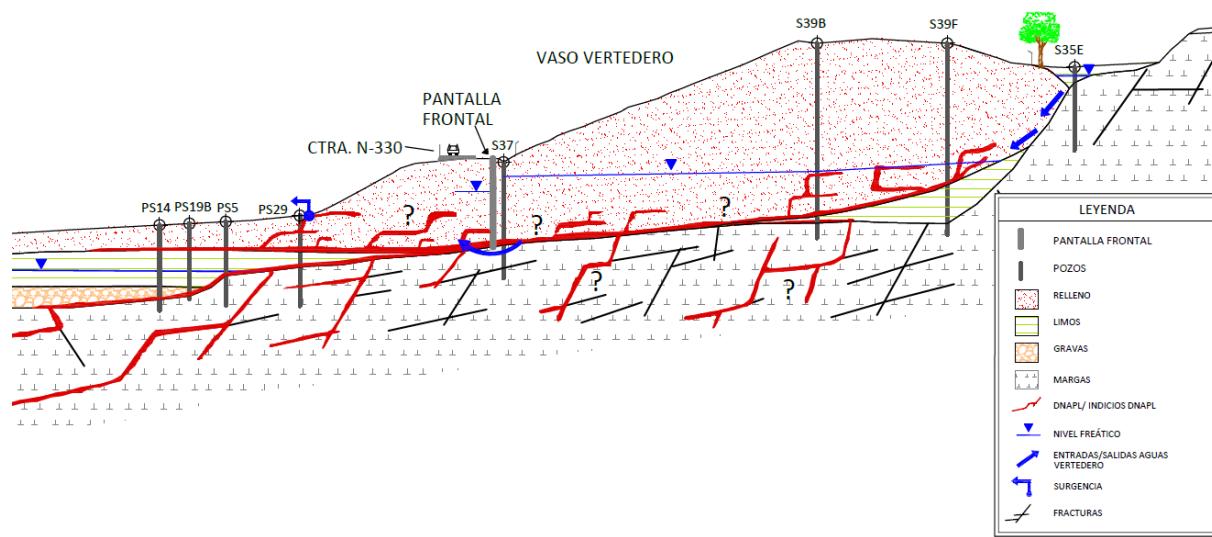


Figura 3: Esquema del vertedero de Sardas. (Plan estratégico de lucha integral contra la contaminación de los residuos generados por la fabricación de lindano en Aragón; Gobierno de Aragón, diciembre 2016).

2.2.2. El vertedero de Bailín

Entre 1984 y 1992 el vertedero de Bailín, a 2 km al sur de Sabiñánigo, fue utilizado para almacenar residuos orgánicos municipales e industriales, además de desechos de la fabricación del lindado de la fábrica Inquinosa. Consta de una superficie de 40 ha. El volumen total estimado de residuos era de unos 210000 m³, equivalente a 429000 toneladas, entre los que se encontraban residuos de HCH (65000 toneladas) y tierras contaminadas (342000 toneladas). En 2014 se produjo el desmantelamiento del antiguo vertedero y su traslado a una nueva celda de seguridad situada a 800 metros (Fernandez et al., 2013).

Aun así, actualmente presenta una pluma de contaminación de DNAPL rica en bencenos, clorobencenos, clorofenoles, alcoholes e isómeros de HCH. Esta pluma se mueve a través de las fracturas entre rocas en sentido descendente hacia el río Gállego, situado solamente a 800 metros. La afectación alcanza suelos y sedimentos, acuíferos (macizo rocoso) y aguas superficiales.

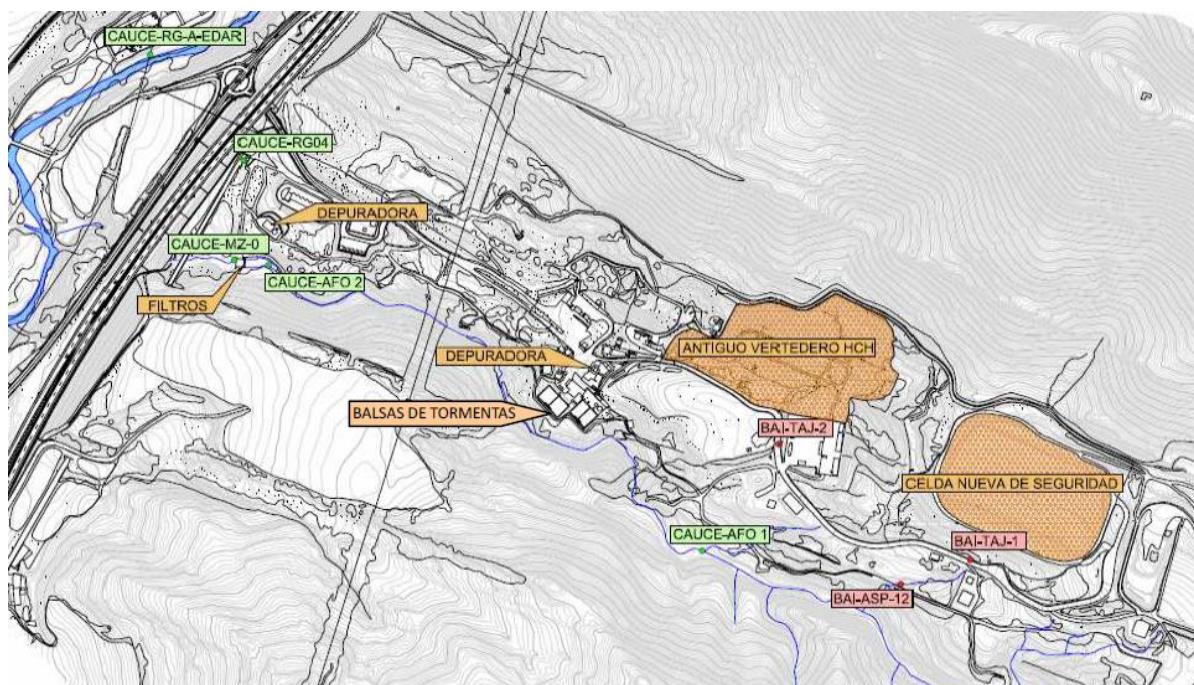


Figura 4: Esquema del vertedero e instalaciones de gestión de residuos del vertedero de Bailín (Diputación de Aragón., 2015).

2.2.3. Situación y acción actual frente a la contaminación por residuos de la fabricación del lindano en Sabiñánigo

Actualmente, el vertedero de Sardas cuenta con las siguientes instalaciones: el propio vaso de vertido, las parcelas al pie del vertedero, una red de control hidrogeológico, instalaciones de drenaje y bombeo de lixiviados y DNAPL, dos balsas de lixiviados y una depuradora. El vertedero se halla sellado de forma superficial y lateral. El sellado consta de unas pantallas perimetrales y frontal de cementobentonita y una lámina de polietileno de alta densidad termosoldada y cubierta de una capa drenante de grava y finalmente tierra vegetal (Diputación de Aragón, 2016).

Los 50000 m³ de residuos depositados en la parte inferior del vertedero no fueron incluidos en el sellado y se encuentran situados junto a un embalse cercano al emplazamiento. El vaso de vertido parecía estar correctamente sellado, pero en 2009 se detectó un surgimiento de DNAPL en la superficie, lo cual desencadenó el descubrimiento de unas plumas de contaminación con esta sustancia que se encontraban desde 5-10 m hasta 40 m de profundidad desde la superficie. Desde entonces, tanto las aguas subterráneas como los lixiviados han estado bajo control ambiental permanente. Los trabajos de remediación y caracterización realizados hasta día de hoy constan de una red de control hidrológico compuesta por unos 100 pozos de monitorización y 14 de bombeo para la extracción de fase libre densa (DNAPL). Ésta es decantada e incinerada externamente.

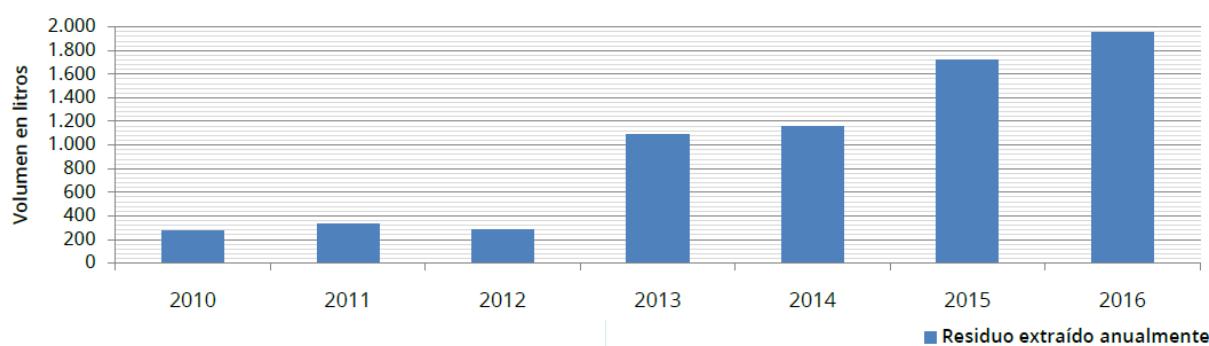


Figura 5: Gráfica de extracciones de DNAPL en Sardas. Evolución del residuo extraído (enero de 2010 a diciembre de 2016). (Plan estratégico de lucha integral contra la contaminación de los residuos generados por la fabricación de lindano en Aragón; Gobierno de Aragón, diciembre 2016).

La fase acuosa (aguas subterráneas y lixiviados) se envía a las dos balsas de lixiviados existentes en la parte baja del emplazamiento donde se encuentra la depuradora. Ésta dispone de un tratamiento fisicoquímico y un filtrado en carbón activo.

Por otra parte, el vertedero de Bailín se compone actualmente del antiguo vertedero de HCH, una nueva celda de seguridad de residuos de HCH, instalaciones de control hidrogeológico de bombeo de fase libre densa (150 sondeos con 10 de bombeo de DNAPL), la depuradora 1 de lixiviados (e instalaciones como depósitos, balsas de tormenta, etc.) asociadas a los vertederos de HCH, la depuradora 2 para el tratamiento de las aguas del barranco de Bailín, un laboratorio de análisis de suelos y aguas y unas instalaciones y oficinas del control y seguimiento ambiental (Diputación de Aragón, 2016).

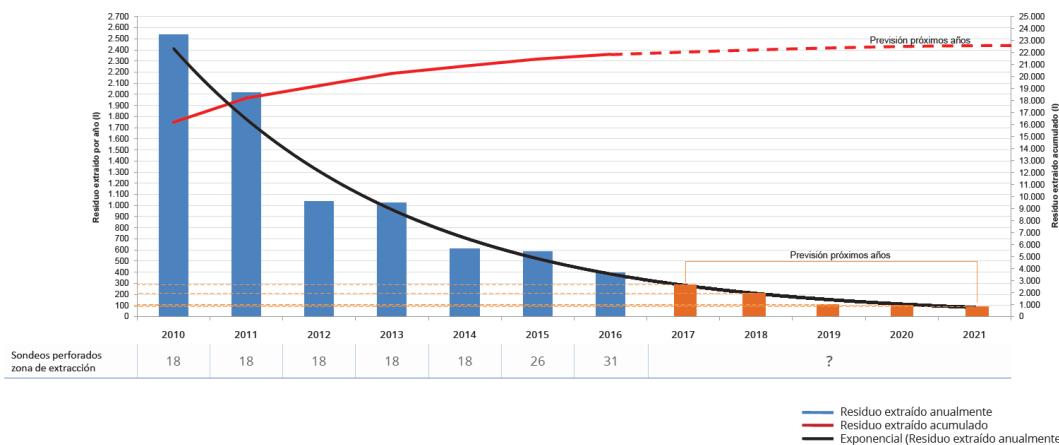


Figura 6: Gráfica de extracciones de DNAPL en Bailín. Evolución del volumen de residuos extraído de enero de 2010 a diciembre de 2016. (Plan estratégico de lucha integral contra la contaminación de los residuos generados por la fabricación de lindano en Aragón; Gobierno de Aragón, diciembre 2016).

En la actualidad, se piensa que la situación de la fase libre extraíble mediante bombeo es próxima al agotamiento en el vertedero de Bailín, y que la persistente se halla adherida a las paredes de roca.

2.3. Degradación del lindano e isómeros de HCH 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.



Algunos de ellos han sido identificados, como algunos hongos, bacterias y cianobacterias; pero muy pocos se han estudiados en profundidad y las rutas de degradación no están bien caracterizadas (Lorenzo, 2006). La biorremediación ha sido aplicada con éxito en situaciones anteriores, tanto en suelos aerobios como anaerobios (Lal, 2007; Wada, 1989).

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.

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 los suelos había organismos capaces de degradar ambos isómeros, que además tenían especificidad de sustrato similares, es decir, los que no degradaban α -HCH tampoco degradaban γ -HCH. Por otro lado, los isómeros β -HCH y δ -HCH parecían ser los más persistentes y difíciles de biodegradar. El estudio sugirió que los microorganismos degradadores de HCHs no proliferaban en suelos no contaminados con HCHs y que el tipo de contaminación es capaz de determinar la composición de la población de microorganismos *in situ* (Lorenzo, 2006).

2.3.1. 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* (Nagata et al, 1999), sin embargo, no se ha descrito en cianobacterias, como es el caso de *Anabaena PCC7120*.

2.3.1.1. 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 (Naseer Sangwan, 2012). El proceso de degradación comienza con una deshidrocloración llevada a cabo por una deshidroclorinasa (LinA). A continuación, actúa una haloalcano deshalogenasa (LinB) y en último lugar 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”. En la ruta “downstream” la primera enzima que actúa es la declorinasa reductiva (LinD) que 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 1 de Material suplementario). En *S. 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 los genes *linA*, *linB* y *linC* se expresan de manera constitutiva, mientras que la expresión de *linD* y *linE* parece ser inducida en presencia de determinados intermediarios metabólicos por la activación mediada por LinR.

2.3.1.2. Degradación del lindano en *Anabaena PCC7120*

Las cianobacterias son organismos fotoautótrofos que se encuentran presentes en una gran variedad de ecosistemas. Algunas de ellas son fijadoras de nitrógeno tomando N₂ del aire y reduciéndolo a amonio (NH₄⁺), incorporando nitrógeno a la cadena trófica (Kuritz, 1998).

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 algunos géneros de cianobacterias como es el caso de *Anabaena PCC7120* son capaces de degradar el lindano (Fillat et al, 2009; Rivera et al, 1997). En presencia de nitrato, *Anabaena PCC7120* es capaz de degradar desde 0,5 µg/ml de lindano hasta 10 ng/ml en un tiempo entre aproximadamente tres a cinco días, dependiendo de la densidad del cultivo inicial. Sin embargo, en ausencia de nitrato, el lindano se degrada mucho más lentamente (Kuritz & Wolk, 1995). 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 declorinación, incluso en presencia de nitrato.

Otros factores que se han descrito que afectan a la capacidad de degradación del lindano de *Anabaena* son la oscuridad y la presencia de amonio, ya que son inhibidores de las funciones del operón *nir* (Rivera et al, 1997). De acuerdo con estos resultados, las enzimas implicadas en el metabolismo del nitrato podrían ser esenciales en la degradación del lindano y se especula que la declorinación de éste puede ser una función de un complejo de reducción nitrato-nitrito de la membrana (Kuritz & Wolk, 1995). A pesar de la importancia de que la cianobacteria *Anabaena* sea 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. En estudios previos de nuestro laboratorio (Castro et al, 2016) se identificaron genes homólogos a los genes lin de *S. Paucimobilis* en *Anabaena PCC7120*. Se identificó el gen *alro353* como un potencial gen *linR* en *Anabaena*. El gen *linR*, como hemos mencionado anteriormente, es el regulador transcripcional de la ruta de degradación de lindano en *S. paucimobilis*. Al estudiar su contexto génico se observó que al igual que el caso de *S. paucimobilis*, había un potencial *linE*, codificando una carbonilo reductasa en el genoma de *Anabaena*. Dicha enzima corresponde con el gen *allo352*. En el mismo trabajo, se estudió si las proteínas *linB* y *linE* estaban conservados en *Anabaena*, y se determinó que *linB* estaba más conservada que *linE*, ya que presenta mayor homogeneidad en su secuencia de aminoácidos en organismos alejados filogenéticamente.

2.4. Efectos fisiológicos de la presencia de lindano en *Anabaena PCC7120*

En estudios anteriores (Bueno et al, 2004) se han estudiado algunos de los efectos fisiológicos que la presencia de lindano genera en la cianobacteria *Anabaena PCC7120* con intención de caracterizarla como un potencial biorremediador. Los resultados mostraron un ligero aumento de la tasa fotosintética de la cianobacteria en presencia de una concentración de 5 mg/L de lindano, así como una disminución en su tasa de crecimiento inicial, que se recupera tras las 72 horas de exposición al pesticida. A concentraciones más altas de lindano, en torno a 10-15 mg/L, la viabilidad de la cianobacteria se veía significativamente disminuida, posiblemente como consecuencia de una inhibición no competitiva del



fotosistema II en la que las unidades activas se vuelven incapaces de reducir la semiquinona Q_A (Bueno et al, 2004). La actividad y cantidad de ferredoxina NADP+ reductasa (FNR) en el cultivo tratado con lindano no presenta cambios significativos respecto al cultivo control ni, en síntesis, ni degradación ni actividad de la enzima. En estudios previos del laboratorio (Abizanda et al, 2017) se determinó la capacidad de crecimiento de la cianobacteria en presencia de lindano, obteniendo resultados congruentes a los anteriormente comentados. En este mismo estudio, se determinó que la concentración de fícobiliproteínas y carotenoides no se ven significativamente afectadas en presencia de lindano, y que el gen *prxA*, relacionado con el estrés oxidativo, sufre una inducción de su expresión en presencia del pesticida.

2.5. Estrés oxidativo en cianobacterias

La vida en la Tierra comenzó en una atmósfera reductora, que se convirtió en oxidante tras el desprendimiento de oxígeno como consecuencia de la fotosíntesis oxigénica. Esto dio lugar al desarrollo de organismos aeróbicos que lo utilizaban como acceptor final de electrones en sus cadenas de transporte. Como contrapartida, tuvieron que hacer frente al estrés oxidativo que sufrían las redes metabólicas, originalmente desarrolladas en un entorno anóxico (Latifi et al, 2009). El oxígeno molecular por sí mismo, no es capaz de oxidar el DNA ni las proteínas, pero a través de la adquisición de electrones, se transforma en especies reactivas de oxígeno (ROS), que resultan dañinas para la mayoría de los seres vivos aeróbicos. Estas especies tienen distintas reactividades, niveles de toxicidad y dianas. Algunas de las más importantes son las siguientes: $^1\text{O}_2$, O_2^- , H_2O_2 y $\text{OH}\bullet$. El oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) reacciona principalmente con proteínas, pigmentos y lípidos (Gorman & Rodgers, 1992). Tanto el anión superóxido (O_2^-) como el radical hidroxilo (OH) son altamente reactivos con las biomoléculas. El radical hidroxilo (OH) es un agente mutagénico, ya que el DNA es diana directa. Los organismos fotosintéticos, además de tener que hacer frente a las especies reactivas de oxígeno provenientes de la respiración, tienen que hacerlo también con aquellas que tienen su origen en la cadena de transporte de electrones de la fotosíntesis. En el apartado 8.2 de Material suplementario se ofrece una explicación más detallada de los mecanismos moleculares que causan el estrés oxidativo.



2.6. Defensas a estrés oxidativo de *Anabaena PCC7120*

En general, los seres vivos han desarrollado distintos tipos de defensas ante el estrés oxidativo, defensas que son tanto enzimáticas (catalasas, superóxido dismutasas (SOD) y peroxidases) como no enzimáticas (glutation, vitaminas A, C, E, carotenoides, etc.).

Las superóxidos dismutasas son enzimas que catalizan la dismutación de dos moléculas de ion superóxido, produciendo peróxido de hidrógeno y oxígeno: $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Estas enzimas necesitan un cofactor metálico para ejercer su función. Existen cuatro tipos de SOD en función del metal: Mn-SOD, Fe-SOD, Cu/Zn-SOD y Ni-SOD. En *Anabaena PCC7120* se han identificado dos tipos de superóxido dismutasas, una de ellas dependiente de manganeso (*sodA*) y otra dependiente de hierro (*sodB*). Además de diferenciarse en el cofactor, también lo hacen en la localización celular. La Fe-SOD es soluble y se halla en el citosol, mientras que la Mn-SOD se halla principalmente asociada a la membrana tilacoidal, protegiéndola del daño oxidativo generado por los iones superóxido (Zhao et al, 2007). Aunque cianobacterias unicelulares no fijadoras de nitrógeno generalmente presentan una única SOD (Banerjee, 2012), las fijadoras de nitrógeno como *Anabaena PCC7120* suelen poseer una combinación de Fe-SOD y Mn-SOD, lo cual ayudaría a la cianobacteria en condiciones de estrés oxidativo en función de la disponibilidad de nitrógeno en el medio.

Las catalasas son enzimas que catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno dando lugar a oxígeno y agua: $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$. En función de sus características físicas y químicas de las catalasas presentes en cianobacterias, éstas pueden clasificarse en tres grupos:

- Catalasas monofuncionales: tienen como grupo prostético un grupo hemo en el cual reside la actividad catalítica de la enzima.
- Catalasas-peroxidases bifuncionales (KatG): también contiene un grupo hemo en su centro activo. Se encuentra en el 30% de las cianobacterias conocidas.
- Catalasas dependientes de manganeso: en lugar de hierro en forma de grupo hemo tiene dos átomos de manganeso en su centro activo y por lo tanto, difiere de las anteriores en el mecanismo catalítico.



El genoma de *Anabaena* PCC7120 contiene los genes de dos catalasas dependientes de manganeso, *alr0998* y *alr3090*. La primera de ellas ha sido la más estudiada. Su sobreexpresión en la cianobacteria aumenta la resistencia al estrés oxidativo inducido por agua oxigenada y provoca una disminución de los niveles de ROS intracelulares (Banerjee, 2012). Respecto a *alr3090*, su expresión aumenta en condiciones de desecación y en condiciones de deficiencia de hierro, situaciones que se han demostrado que inducen estrés oxidativo en *Anabaena* sp. PCC7120 (Latifi et al., 2009).

Además de las defensas frente al estrés oxidativo previamente comentadas, *Anabaena* PCC7120 cuenta con la presencia de una familia de proteínas reguladoras de hierro denominadas Fur que controlan la captación de este oligoelemento esencial para la supervivencia celular, ya que es cofactor de varias enzimas y es un elemento estructural de una gran cantidad de proteínas. La proteína Fur (ferric uptake regulator) es un regulador global en la mayoría de los procariotas que controla un gran número de genes. Fur es un represor clásico que utiliza hierro como co-represor y que se une a regiones específicas del DNA en forma de dímero. En *Anabaena* se han identificado tres genes diferentes que codifican para homólogos de Fur. FurA regula la transcripción de la flavodoxina, producto del gen *isiB*, en condiciones reductoras y presencia de Mn²⁺ (Hernandez et al., 2006). La flavodoxina actúa como un transportador de electrones entre el fotosistema I y la ferredoxina-NADP⁺ reductasa (FNR) y se induce en deficiencia de hierro y estrés oxidativo (Medina et al, 2005).

FurB, actúa como represor clásico del mismo modo que FurA, en condiciones reductoras, pero en presencia de Zn en este caso. Tanto FurA como FurB son capaces de unirse al grupo hemo, el cual inhibe por completo su unión al DNA (Fillat et al, 2009). Por otra parte, la proteína furB es un elemento clave en el control de la respuesta a estrés oxidativo de *Anabaena* PCC7120 (Sein-Echaluce, 2015). En condiciones estándar, el nivel de transcripción de FurB en cianobacterias es más bajo que el de FurA. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo, su nivel de transcripción aumenta. Esto, combinado con el hecho de que FurB se une al DNA de forma inespecífica y lo protege del daño generado por los radicales hidroxilo y DNasa I *in vitro*, indica que FurB podría tener una doble función en la célula, actuando como represor génico o como protector del DNA, según su nivel de expresión (Fillat et al,



2009). Por otra parte, está bien documentado que el metabolismo del hierro está estrechamente relacionado con la respuesta a estrés oxidativo, pero también la homeostasis del zinc, controlada por la proteína furB, es esencial. La presencia de FurB aumenta la respuesta a estrés oxidativo mientras que su ausencia aumenta la sensibilidad de la cianobacteria a la presencia de peróxido de oxígeno (H_2O_2) (Sein-Echaluce, 2015). Respecto a la FNR, anteriormente nombrada por recibir electrones del fotosistema I a través de la ferredoxina; en cianobacterias se encuentra asociada a las ficoliproteínas que forman los ficolisomas en la membrana de los tilacoides. Debido a que los ficolisomas son el principal sistema de recolección de energía lumínica de las cianobacterias, mediante los complejos antena, la estructura y composición de los mismos nos da una información bastante precisa del estado fisiológico de la cianobacteria. Se ha observado que la presencia de lindano produce una separación de la FNR de este complejo antena (Bueno et al, 2004).

3. Objetivos

Dado el desconocimiento de la respuesta fisiológica y la ruta de degradación del γ -HCH en cianobacterias, en este trabajo se propone caracterizar parámetros relacionados con la capacidad de respuesta a estrés oxidativo de las cianobacterias, así como determinar su capacidad fotosintética y su metabolismo respiratorio en presencia de lindano. Así mismo, se han estudiado aspectos de la degradación de γ -HCH que pueden aportar datos para un futuro planteamiento de biorremediación. Los objetivos específicos de este trabajo son los siguientes:

- Caracterización fisiológica de la respuesta de *Anabaena* PCC7120 a la presencia de lindano.
- Estudio de la expresión de los genes homólogos a *lin* en *Anabaena* PCC7120 en presencia de lindano con objeto de identificar las enzimas implicadas en su posible degradación.
- Determinar la presencia de cianobacterias con capacidad de degradación de lindano en muestras procedentes de Bailén y Sardas (Sabiñánigo, Huesca).
- Aplicar el método de inmovilización de células en perlas de alginato y estudiar la capacidad de degradación de lindano de *Anabaena* PCC7120.



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. El medio de cultivo utilizado fue BG11 (Rippka, 1979) modificado en el cual se sustituyó el citrato férrico amónico por sulfato férrico, ya que se ha descrito en la literatura que el amonio inhibe la degradación de lindano por parte de *Anabaena PCC7120* (Kuritz, 1998). La solución de macronutrientes contiene: 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 MgSO₄ x 7 H₂O y 0.02 g/L de Na₂CO₃. Esta solución esterilizó mediante autoclavado. 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 H₃BO₃, 1.81 g/L 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.

4.1.1. Cultivo en un medio líquido

Se cultivó la cianobacteria *Anabaena PCC7120* en frascos de cultivo de Roux de 1 L con aireación constante, una temperatura de 28°C y una intensidad de luz de 30 μmol fotones m⁻²s⁻¹.

El pesticida que se utilizó en los experimentos fue el isómero gamma de hexaclorociclohexano:

- Isómero gamma (lindano) comercial de 97% de pureza de la compañía Sigma-Aldrich. Se preparó una solución stock de 70 g/L disolviendo 0.070 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.

4.1.2. 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 0,5. Los distintos cultivos consistían en: un cultivo de *Anabaena PCC7120* como control, un cultivo con *Anabaena PCC7120* e isómero γ-HCH a una



concentración de 7 mg/l disuelto en DMSO, y cultivos de *Anabaena* PCC7120 con DMSO (para estudiar si éste interfiere en la expresión génica). Se realizaron tres réplicas biológicas de cada uno de los cultivos. Los experimentos se llevaron a cabo en un incubador con luz de una intensidad lumínica de 30 μmol fotones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y con una agitación constante de 200 rpm.

4.1.3. Preparación de perlas de alginato de *Anabaena* PCC7120.

Se preparó una solución al 1% de ácido algínico en agua junto a un inóculo de cianobacterias *Anabaena* PCC7120 a partir de iguales volúmenes de ácido algínico al 2% y de inóculo de cianobacterias a una densidad óptica de 0,5. Mediante una pipeta de plástico con un diámetro suficientemente ancho, se añade la solución anterior a un vaso de precipitados que contiene solución de cloruro cálcico al 2%. Al contacto con la solución, las gotas de disolución gelifican generando estructuras esféricas a las que denominamos perlas.

4.1.4. Estudios de la degradación de isómeros por *Anabaena* PCC7120 en perlas de alginato

Los experimentos de degradación se realizaron con el isómero γ -HCH y se llevaron a cabo en las mismas condiciones que el experimento de expresión génica, pero el cultivo de *Anabaena* PCC7120 con una densidad óptica de 0,55 se encapsuló en unas perlas de alginato. Las muestras consistieron en dos réplicas de medio BG11 modificado con γ -HCH (sin células) como control de degradación y evaporación; y dos réplicas biológicas de *Anabaena* PCC7120 con γ -HCH. Se tomaron 10 ml del cultivo control a tiempo $t = 0$ días, $t = 4$ días y $t = 7$ días como control de la evaporación y la degradación química; y del cultivo con medio y células a $t = 4$ días y $t = 7$ días para estudiar la degradación llevada a cabo por *Anabaena* PCC7120 dentro de las perlas. Se separó el sobrenadante, se congeló a -20°C y se envió al laboratorio de análisis de HCH de Bailén II (Sabiñánigo, Huesca) de Sarga-Gobierno de Aragón para su análisis por cromatografía de gases con detector de Masas (AGILENT Serie 7890A).



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

Una de las principales dificultades del trabajo con RNA es evitar su degradación por RNAsas, ribonucleasas capaces de degradar rápidamente el RNA, aunque se hallen en bajas cantidades. Estas enzimas son muy estables y pueden ser de origen tanto endógeno (liberadas tras la lisis celular) como exógeno (contaminaciones en la manipulación). Por ello se recomienda el trabajo en condiciones asépticas y tomar precauciones a distintos niveles:

- El investigador debe llevar guantes que renueve con frecuencia y debe evitar hablar cerca del área de trabajo con RNA.
- Las disoluciones deben prepararse con reactivos libres de RNAsas. El agua utilizada para su preparación debe ser autoclavada y libre de RNAsas.
- En el lugar de trabajo, la poyata, las campanas, las micropipetas, las gradillas y cualquier otro material que se utilice debe haber sido lavado previamente con NaOH 0.4 M.

4.2.1. Toma de muestras de RNA de *Anabaena PCC7120*

Se trabaja en frío y lo más rápidamente posible: de esto depende principalmente lo representativa que sea la muestra tomada, ya que la población de RNA va a cambiar con el tiempo, debido a su estabilidad y a que la maquinaria transcripcional va a funcionar hasta que se congelen las muestras. El protocolo seguido 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 17900 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.

4.2.2. Extracción del RNA y tratamiento con DNasa I del RNA de *Anabaena PCC7120*

Se utilizó el protocolo previamente descrito (M. Ausubel, 2000) modificado:

- 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 agitó 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 g 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.



4.2.3. Electroforesis del RNA de *Anabaena* PCC7120

Se sometió al RNA extraído a una electroforesis en gel de agarosa al 1% para comprobar su integridad.

Se preparó el gel disolviendo 0.5 g de agarosa en 50 ml de TBE (1x).

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 MultiAnalyst 1.1 (BioRad Laboratorios, 1997).

4.2.4. Cuantificación del RNA de *Anabaena* PCC7120

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 A₂₆₀ (ssRNA) = 40 µg/ml, se puede calcular la concentración de RNA a partir de su medida de A₂₆₀.

El ratio A₂₆₀/ A₂₈₀ 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.

4.2.5. Comprobación de la pureza del RNA aislado de *Anabaena* PCC7120

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 µl de RNA más 500 µl 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. El gen *rnpB* es un gen constitutivo que se utiliza como



control interno de la expresión. Se dispensaron en una placa de 96 pocillos 20 µl del mix y 10 µl de dilución y se analizó en un termociclador 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems.

4.2.6. Retrotranscripción del RNA de *Anabaena PCC7120*

Mediante la retrotranscripción se obtuvo el cDNA total (ssDNA) complementario al RNA total aislado. La retrotranscripción se llevó a cabo utilizando “random primers”. Los random primers son cebadores cortos (10 KB) que se utilizan para secuenciar DNA al azar cuando éste presenta una secuencia desconocida. El cebador se une al ADN patrón en secuencias complementarias de ubicación desconocida. Además, los random primers aseguran que la primera hebra de síntesis se produzca eficientemente a partir de todas las moléculas de RNA presentes, tanto mRNA (mensajero) como rRNA (ribosómico).

La mezcla de reacción se componía de 1.5 µg de RNA, 2 µl de tampón de hibridación 1x (Tris-HCl 10 mM (pH 8), EDTA 1 mM, KCl 150 mM, en stock 10x) y 1 µl de “random primers” (300 ng/µl). Se completó el volumen hasta 20 µl con H₂O DEPC.

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



4.3. Estudio de expresión génica mediante PCR a tiempo real

4.3.1. Estudio de la amplificación de fragmentos de genes de interés

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”).

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, previamente diluido 1/50. 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.

4.4. Técnicas de trabajo con DNA

4.4.1. Aislamiento del DNA total a partir de muestras de campo

4.4.1.1. Rotura celular

El protocolo seguido se basa en el descrito (Neilan, 1999) con modificaciones.

Se trabajó con 5L de agua provenientes de las balsas de tormenta y lixiviado de Bailín y de Sardás, respectivamente, en el municipio de Sabiñánigo.

- Se obtuvo el pellet por centrifugación y se resuspendió en 500 µl de tampón Tris-HCl 50mM pH 8, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl.
- Se añadieron a las muestras 50 µl de lisozima de un stock de 10 mg/ml de forma que la concentración final fuese de 1 mg/ml y se incubó 30 minutos a 56°C.
- Se añadieron 5 µl de proteinasa K (stock 20 mg/ml) y 20 µl de SDS al 10% y se incubó a 56°C hasta que la disolución estuvo transparente.



4.4.1.2. Extracción fenol-cloroformo

- Se añadió fenol en una proporción 1:1 (v: v) con la muestra. Se agitó con el vortex y se centrifugó 1 minuto a 6800 g. Se retiró la fase superior acuosa que contenía el DNA.
- Se repitió esta extracción.
- Se añadió fenol y cloroformo en una proporción 1/2: 1/2: 1 (v: v: v) con la muestra. Se agitó con el vortex y se centrifugó 1 minuto a 6800 g. Se retiró la fase acuosa y se pasó a otro eppendorf.
- Se añadió cloroformo en proporción 1:1 (v: v) con la muestra. Se agitó con el vortex y se centrifugó 1 minuto a 6800 g. Se retiró la fase superior acuosa.

4.4.1.3. Precipitación del DNA

- Se añadieron 0.1 volúmenes de acetato de sodio (3M pH = 5.5) y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se agitó con el vortex y se dejó precipitar aproximadamente 2 horas a -20°C.
- Posteriormente, se centrifugó a 17900 g durante 20 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante.
- Se lavó el pellet con etano al 70%, sin resuspender. Se centrifugó 5 minutos a 17900 g a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet.
- Se resuspendió el pellet en 30 µl de agua milliQ estéril y realizó un tratamiento con 1 µl de RNAsa 10 mg/ml durante 10 minutos.
- El DNA obtenido se visualizó en un gel de agarosa 0.6% a 65V.

4.5. Técnicas analíticas de proteínas

4.5.1. Cuantificación de proteínas

4.5.1.1. Método del ácido bicinchonínico (BCA)

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 añadieron 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 45 segundos descansando 30 segundos entre cada ciclo. Con una amplitud del 80% y ciclo 0.5. El proceso se lleva a cabo en baño de hielo.
- Se centrifugaron las muestras 30 minutos a 17900 g.
- Para la determinación de proteína se utilizó el sobrenadante, que constituye el extracto crudo.
- Se cuantificó la proteína total en el extracto crudo utilizando el método del BCA, aplicando el protocolo de la casa comercial ThermoFisher siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.5.2. Electroforesis de proteínas

4.5.2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Los geles de poliacrilamida se prepararon de acuerdo al método desarrollado por Laemmli (1970) basado en un sistema discontinuo de geles: un gel separador con un porcentaje de poliacrilamida variable del 12-17% y un gel concentrador con un porcentaje fijo del 5% de poliacrilamida. La presencia en el gel del detergente dodecilsulfato sódico (SDS) como desnaturalizante permite que la separación tenga lugar en función únicamente del peso molecular de las proteínas. La composición de los geles se detalla en la tabla x. los geles se prepararon utilizando un equipo Dual Gel Caster (GE Healthcare).

Reactivos	Gel separador 17%	Gel concentrador 5%
H ₂ O	0,72 ml	2,8 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	4,48 ml	x
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	x	0,5 ml
Acrilamida:Bisacrilamida 30%	6,8 ml	0,6 ml
SDS 10% (p/v)	60 µl	20 µl
PSA 10% (p/v)	40 µl	20 µl
TEMED	20 µl	20 µl

Tabla 1: Composición de los geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Se detallan las cantidades de reactivos necesarias para preparar geles al 17%.



Para la preparación de las muestras, una vez realizado el tratamiento deseado a las proteínas, se añadió tampón de carga cuya composición final fue 50 mM Tris/HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, y 0,02% azul de bromofenol. A continuación, se hirvieron las muestras 5 minutos a 95°C para desnaturalizar las proteínas y se aplicó un pulso de centrífuga antes de cargarlas en el gel. Para la identificación de las proteínas se utilizó el marcador de pesos moleculares “Low Molecular Weight Calibration Kit for DSD Electrophoresis” (GE Healthcare).

Una vez aplicadas las muestras a los pocillos, la electroforesis se llevó a cabo suministrando una corriente constante de 35 mA por gel durante 45 min aproximadamente, en un tampón compuesto por 25 mM Tris/HCl pH 8,8, 200 mM glicina, 3,5 mM SDS. Se utilizó un dispositivo de electroforesis vertical Mighty Small II SE250/SE260 (Hoefer) junto con una fuente de corriente PowerPac Basic (Bio-Rad).

Para visualizar las proteínas se tiñó el gel de poliacrilamida durante al menos 20 min con una disolución colorante compuesta por 10% ácido acético, 45% metanol, 45% agua y 0,25% (p/v) Coomassie Blue R-250.

El colorante azul de Coomassie presenta una sensibilidad de 0,2-0,5 µg de proteína y se une de forma no covalente a residuos básicos e hidrofóbicos de la proteína. Para eliminar el exceso de colorante en el gel, se realizaron varios lavados con una disolución decolorante cuya composición era 10% ácido acético, 25% metanol y 65% agua.

4.6. Técnicas inmunoquímicas

4.6.1. Transferencia de proteínas a membranas: Western Blot

Una vez realizada la electroforesis de geles de SDS-PAGE al 15%, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore), aplicando un voltaje de 15 V durante 90 min con un dispositivo Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) y una fuente de corriente PowerPac 300 (Bio-Rad). Antes de la transferencia, se lavó la membrana de PVDF con metanol durante 10 segundos y con tampón de transferencia (48 mM Tris/HCl pH 9,2, 39mM glicina, 0,4% SDS y 20% metanol) durante 2

minutos. También se sumergieron el gel y los papeles de filtro en tampón de transferencia unos 2 minutos. El montaje final se realizó siguiendo el esquema de la Figura 7.

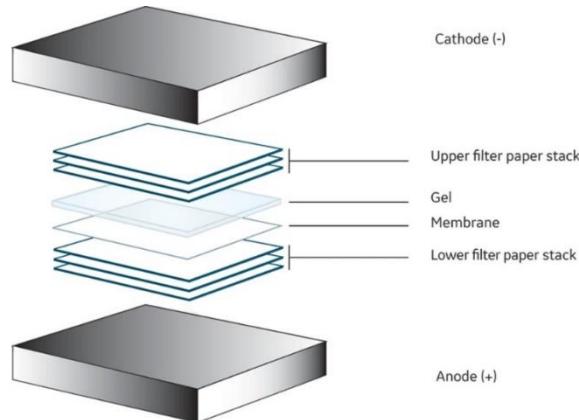


Figura 7: Disposición del gel y la membrana de PVDF durante la transferencia.

4.6.2. Detección específica mediante anticuerpos de proteínas en filtros: Western Blot

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se bloqueó O.N. a temperatura ambiente en una disolución de TBST (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl y 0,1% Tween 20) y leche descremada al 4%. Al día siguiente, tras efectuar 3 lavados de 5 minutos con TBST, se incubó la membrana durante 1 h con los anticuerpos primarios correspondientes. Tras lavar de nuevo con TBST, se incubó durante otra hora con anticuerpo anti-IgG conjugado con peroxidasa. A continuación, la membrana se lavó 3 veces con TBST y 2 veces con tampón fosfocitrato (ácido cítrico 24,3 mM, Na₂HPO₄ 5,14 mM pH 5,3). Finalmente, se introdujo en la disolución de revelado (20 mg TMB, 80 mg DONS, 10 ml etanol absoluto y 15 µl H₂O₂) hasta observar la aparición de bandas color azul asociadas a la proteína.



4.7. Determinación de actividades enzimáticas de extracto crudo de *Anabaena*

PCC7120

4.7.1. Determinación de la actividad catalasa de un extracto celular

Para determinar la actividad catalasa en extractos celulares de *Anabaena sp.* se realizaron algunas modificaciones del protocolo descrito por otros autores (González, 2010; Roland F. Beers, 1952). Este método se basa en que el peróxido de hidrógeno presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 240 nm, pero no así los productos de la reacción (H_2O y O_2). Así, al añadir agua oxigenada sobre un extracto proteico de *Anabaena sp.* que contiene catalasa, el avance de la reacción puede seguirse por la disminución de la absorbancia a 240 nm.

1. Se centrifugan 50 ml de cultivo (en fase exponencial tardía) a 1700 g durante 10 minutos a 4°C.
2. Se resuspenden las células en 1 ml de tampón fosfato (KH_2PO_4/K_2HPO_4) 50 mM pH 7.
3. Se sonican las células 5 veces con ciclos de 45 segundos y pausas de 30 segundos, empleando una amplitud del 80% y ciclo 0.5.
4. Se determina la cantidad de proteína total mediante el método del BCA.
5. Se mezclan 300-600 µg del extracto proteico en una cubeta de cuarzo con H_2O_2 a una concentración final de 20 mM y se mide rápidamente la absorbancia a 240 nm a lo largo del tiempo (a intervalos de 1 segundo durante 5 minutos). Se utiliza un blanco que contiene la misma cantidad de extracto proteico, pero sin agua oxigenada.
6. La actividad de la enzima catalasa se calcula como:

$$\frac{U}{mg} = \frac{\frac{\Delta Abs 240}{min} * 1000}{43.6 * \frac{mg\ proteinas}{ml\ reaccion}}$$

Donde 1U se define como la cantidad de enzima que cataliza la descomposición de 1 µmol de H_2O_2 por minuto. Todas las medidas se llevaron a cabo por triplicado en un espectrofotómetro Specord ® 250 Plus Analytic Jena.

4.7.2. Determinación de la actividad superóxido dismutasa en un extracto celular

La actividad superóxido dismutasa (SOD) se determinó con algunas modificaciones del método ya descrito. La SOD es la enzima que cataliza la reacción $O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ y el fundamento de este método se basa en la capacidad de esta enzima para bloquear la reducción del colorante nitro-azul de tetrazolio (NBT) por los aniones O_2^- .

En este procedimiento, la riboflavina excitada por la luz ultravioleta oxida el TEMED (donador de electrones) y reduce el O_2 del aire a O_2^- . Los iones superóxido provocan la reducción del NBT, que pasa de la forma oxidada (incolora) a la reducida (azul, con absorbancia a 560 nm). El fundamento para detectar su actividad SOD reside en su capacidad para bloquear la reducción del colorante nitro-azul de tetrazolio (NBT) por los aniones O_2^- . La actividad SOD elimina el O_2^- , disminuyendo la aparición del color azul (reducción del NBT).

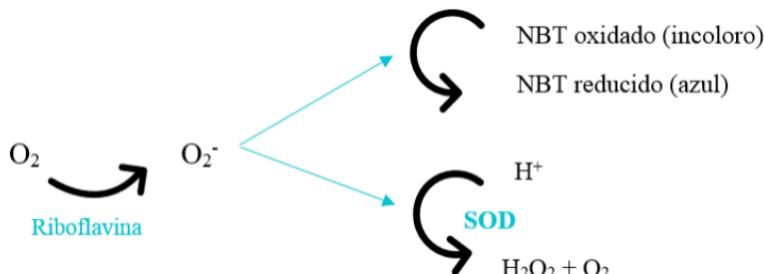


Figura 8: Reacciones que tienen lugar en el protocolo de determinación de la actividad superóxido dismutasa.

El protocolo empleado fue el siguiente:

1. Se centrifugan 50 ml de cultivo 1700 g durante 10 minutos a 4°C y se elimina el sobrenadante.
2. Se resuspenden las células en 1 ml de tampón fosfato 67 mM pH 7.8 y se sonican 5 veces con ciclos de 45 segundos y pausas de 30 segundos, empleando una amplitud del 80% y ciclo 0.5.
3. Se centrifuga el extracto celular durante 5 minutos a 17900 g y 4°C para depositar los restos celulares.
4. Se determina la concentración de proteínas del extracto resultante mediante el método de la BCA.
5. En cubetas espectrofotométricas de plástico se preparan las mezclas de reacción:



Cubeta	Extracto celular	Tampón fosfato 67 mM pH 7.8	EDTA 100 mM (conc. final 6.4 mM)	NBT 1.2 mM (conc. Final 41 μM)
Blanco (x2)	-	900	65	35
C. negativo	-	900	65	35
Muestra	600	Completar	65	35

Tabla 2: Cantidad de reactivos por cubeta para determinar la actividad superóxido dismutasa.

6. Se añaden riboflavina y TEMED a las cubetas correspondientes y se homogeniza bien:

Cubeta	Riboflavina 0.12 mM (conc. final 2.3 μM)	TEMED dil. 1/1000 (conc. final 23.5 μM)	Tampón fosfato 67 mM pH 7.8
Blanco (x2)	-	-	23.6
C. negativo	20	3.6	-
Muestra	20	3.6	-

Tabla 3: Cantidad de reactivos por cubeta para determinar la actividad superóxido dismutasa.

7. Se hace el blanco y se mide la absorbancia a 560 nm de todas las cubetas.
8. Se iluminan las cubetas (a excepción del blanco) durante 10 minutos con luz UV.
9. Se mide de nuevo la absorbancia a 560 nm.
10. Se determina la ΔAbs560/min en el control negativo (la variación será máxima porque no hay SOD) y en la muestra. El porcentaje de inhibición de la SOD se calcula como:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\left(\frac{\Delta \text{Abs}560}{\text{min}}\right) \text{ control negativo} - \left(\frac{\Delta \text{Abs}560}{\text{min}}\right) \text{ muestra}}{\left(\frac{\Delta \text{Abs}560}{\text{min}}\right) \text{ control negativo}} * 100$$

Dado que 1U de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que provoca una inhibición del 50%:



$$\text{Actividad (U)} = \frac{\% \text{ inhibición}}{50}$$

Dividiendo las U entre los mg de proteínas del extracto proteico se tiene la actividad expresada como U/mg:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\left(\frac{\Delta \text{Abs}560}{\text{min}} \right) \text{ control negativo} - \left(\frac{\Delta \text{Abs}560}{\text{min}} \right) \text{ muestra}}{\left(\frac{\Delta \text{Abs}560}{\text{min}} \right) \text{ control negativo}} * 100$$

4.7.3. Medida de la actividad diaforasa de la FNR de *Anabaena PCC7120* en un extracto celular

Se denomina actividad diaforasa a la capacidad que tiene la FNR para reducir sustratos artificiales *in vitro* en presencia de NADPH. Los compuestos más utilizados son el DCPIP (2,6-diclorofenol-indofenol) y el ferricianuro. Cuando se utiliza 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) como acceptor de electrones de la actividad diaforasa, el color azul del DCPIP oxidado desaparece al reducirse. La disminución de absorbancia a 620 nm se utiliza para cuantificar dicha reducción, sabiendo que el coeficiente de extinción molar del DCPIP es 21 mM⁻¹cm⁻¹.

La actividad para proteínas solubles se ha determinado a temperatura ambiente en las condiciones de ensayo que se indican a continuación:

Reactivos	Cubeta muestra (μl)	Cubeta referencia (μl)
DCPIP 0,19 mM	600	400
NADPH 2 mM	100	-
Tris/HCl 50 mM pH8	300-x	600
Muestra enzimática	x	-

Tabla 4: Cantidad de reactivos por cubeta para determinar la actividad diaforasa de la FNR.



La reacción se inicia con la adición de FNR. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-Visible Spectrophotometer Varian.

4.8. Otras técnicas analíticas

4.8.1. Medidas con el electrodo de oxígeno de tipo Clark

Se midió la producción y desaparición de oxígeno a lo largo del tiempo con un electrodo de tipo Clark para determinar la tasa fotosintética y respiratoria de las cianobacterias. Para la realización de las mediciones se empleó el dispositivo ChloroLab 2 System, que consiste en un electrodo de oxígeno Oxytherm (Hansatech) con un cátodo de platino y un ánodo de plata recubierto de una cámara de reacción termostatizada. Los datos se procesaron utilizando el software O₂View proporcionado por el fabricante.

Para la calibración del electrodo se siguieron las instrucciones indicadas por el programa O₂View, simulando condiciones extremas de concentración de oxígeno:

- Concentración máxima: se introduce agua destilada bien aireada en la cámara de reacción
- Concentración mínima: se introduce en la cámara una disolución de ditionito de sodio, que consume el oxígeno a través de la reacción: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaHSO}_4 + \text{NaHSO}_3$

Una vez calibrado el dispositivo se tomaron las medidas de tasa fotosintética y respiratoria de los cultivos de cianobacterias, para lo que se introdujo en la cámara de reacción 1mL de cultivo a una densidad óptica de 0,5. Para la medición de la respiración se midió la variación de concentración de oxígeno a 25°C, en oscuridad y con un 65% de agitación y para la tasa de fotosíntesis se emplearon las mismas condiciones que para la respiración pero en lugar de condiciones de oscuridad se realizó la medición con intensidades luminosas de 40, 100 y 400 µE/m²s. Los resultados se expresaron como $\frac{\mu\text{mol O}_2}{\text{n}^\circ \text{ células}} * \text{min}$. Todas las medidas se llevaron a cabo a 25°C.



5. Resultados

5.1. Respuesta morfológica y fisiológica de *Anabaena PCC7120* a la presencia de γ -HCH

La presencia de γ -HCH en su límite de solubilidad puede causar una serie de cambios en la fisiología de *Anabaena PCC7120* que interesa caracterizar. Se estudian las alteraciones en aspectos claves como es su capacidad fotosintética, su tasa de respiración, actividades enzimáticas implicadas en la respuesta a estrés oxidativo y potenciales alteraciones morfológicas.

5.1.1. Estudio de la afectación morfológica de las células de *Anabaena PCC7120* en presencia de γ -HCH

Para estudiar si la exposición al lindano a una concentración de 7 mg/L tiene alguna consecuencia en la morfología de la cianobacteria se utilizó un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 50i. 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 0,5. Los distintos cultivos consistían en: un cultivo de *Anabaena PCC7120* como control y un cultivo con *Anabaena PCC7120* con isómero γ -HCH a una concentración de 7 mg/l. Se realizaron dos réplicas biológicas de cada uno de los cultivos. Los experimentos se llevaron a cabo en un incubador con luz de una intensidad lumínica de 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y con una agitación constante de 200 rpm. Se tomaron muestras a tiempo 48h, 72h y 5 días. Las imágenes tomadas se muestran en la Figura 9.

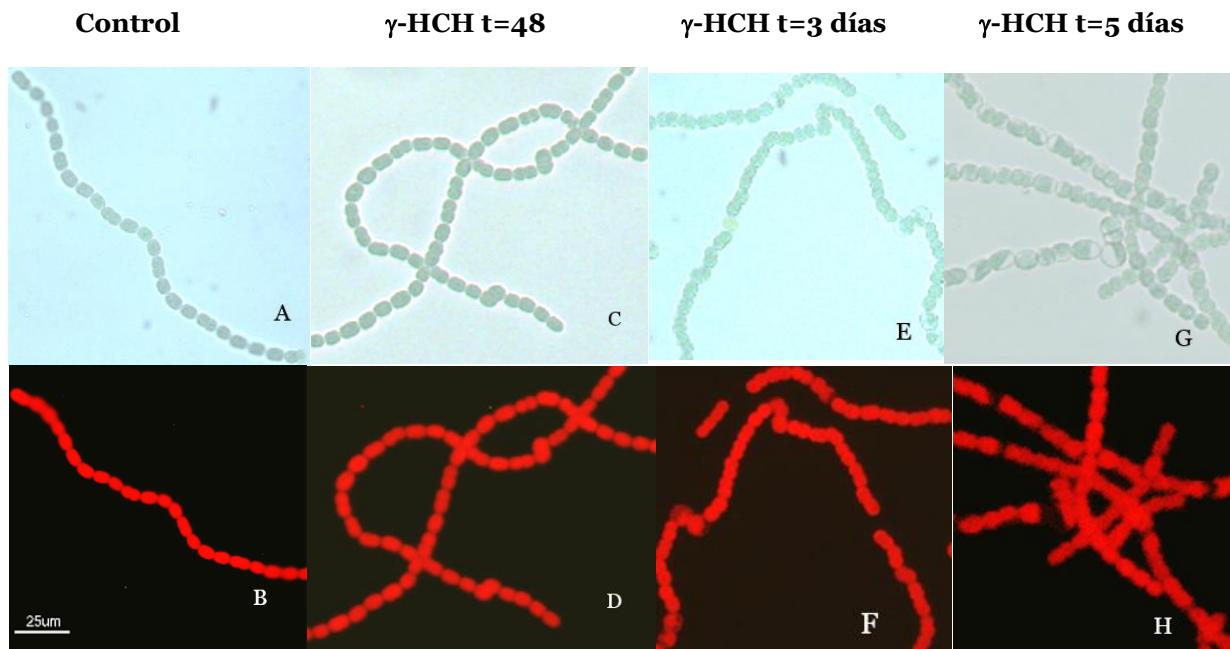


Figura 9: A, B) Cianobacteria *Anabaena* PCC7120 control al microscopio de fluorescencia. C y D) Cianobacteria *Anabaena* PCC7120 tras 48 horas de exposición a γ -lindano al microscopio de fluorescencia. E y F) Cianobacteria *Anabaena* PCC7120 tras 3 días de exposición a γ -lindano al microscopio de fluorescencia. G y H) Cianobacteria *Anabaena* PCC7120 tras 5 días de exposición a γ -lindano al microscopio de fluorescencia. En cada caso, la imagen ha sido tomada tanto en campo claro como en filtro de luz verde. Todas las imágenes se refieren al control, que se mantuvo inalterado durante todo el experimento.

Tras 48 horas en presencia de lindano, las células no muestran excesivos cambios respecto al control (Imágenes A y B), ni morfológicamente ni en la formación, longitud o disposición de los filamentos (Imágenes C y D). Sin embargo, de forma aislada, aparecen unas células de mayor tamaño que presentan el patrón de división alterado y una fluorescencia uniforme. Tras 3 días de exposición al lindano, la presencia de células de mayor tamaño es más frecuente y la integridad de la célula parece fuertemente afectada. Se observa que la fluorescencia debida a la clorofila y pigmentos ha disminuido ligeramente y está distribuida en el interior de la célula de forma menos uniforme. Puede observarse la presencia de algunas células de gran tamaño con morfología ovoide y con un claro retraimiento citoplasmático y cambios en el apilamiento de las membranas tilacoidales (imágenes E y F). Esto podría deberse a efectos ya letales del pesticida, con alteración de paredes celulares. Tras 5 días de exposición al pesticida,

aumenta el número de células que presentan retraimiento citoplasmático y fluorescencia no homogénea (imágenes G y H). Existe la posibilidad de que se trate de vesículas de gas, frecuentes en cianobacterias para conferirles flotabilidad, pero no se observó que subieran a la superficie. La fluorescencia es difusa y menor que en las células control, correspondiendo a la zona donde se ubican los tilacoides.

5.1.2. Fotosíntesis y Respiración de *Anabaena PCC7120* en presencia de γ -HCH

Se estudió la tasa fotosintética de *Anabaena PCC7120* en presencia de lindano a una concentración de 7 mg/L y a distintas intensidades de luz: baja (40 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$), media (100 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) y alta (400 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$), tras 48 h en presencia del pesticida. Los resultados se muestran en la Figura 10.

Los resultados obtenidos, representados en la Figura 10, indican que la tasa de fotosíntesis de *Anabaena PCC7120* en presencia de 7 mg/L de lindano no presenta cambios significativos a 40 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ni 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ de intensidad de luz. Sin embargo, a una intensidad lumínica de 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ se observa un aumento de la tasa fotosintética de la cianobacteria en presencia de lindano. Los datos de fotosíntesis se han normalizado respecto al número de células de los cultivos control y tratados respectivamente.

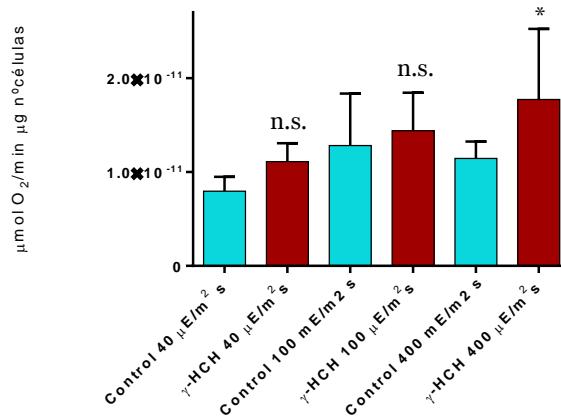


Figura 10: Afectación de la capacidad de fotosíntesis de *Anabaena PCC7120* en presencia de lindano (7 mg/L) a distintas intensidades de luz. La tasa de fotosíntesis se ha determinado en base a la liberación de oxígeno producido por la cianobacteria. Los datos se han referido al control sin lindano a cada intensidad de luz. El experimento se realizó con dos réplicas biológicas y tres técnicas. Las barras de error representan la desviación estándar. La significancia de la variación se determinó mediante un test estadístico t-test. n.s.: no significativo, *: significativo con un p-valor inferior a 0,05.

La capacidad de respiración de *Anabaena* PCC7120 se determinó en las mismas condiciones experimentales que la fotosíntesis, pero el experimento se llevó a cabo en oscuridad. Este proceso consume oxígeno en lugar de producirlo. Los resultados se muestran en la Figura 11.

Los resultados representados en la Figura 11 muestran que *Anabaena* PCC7120 no sufre un cambio significativo de su tasa de respiración en presencia de lindano a una concentración de 7 mg/L. Los datos de respiración se han normalizado también respecto al número de células de los cultivos control y tratados respectivamente.

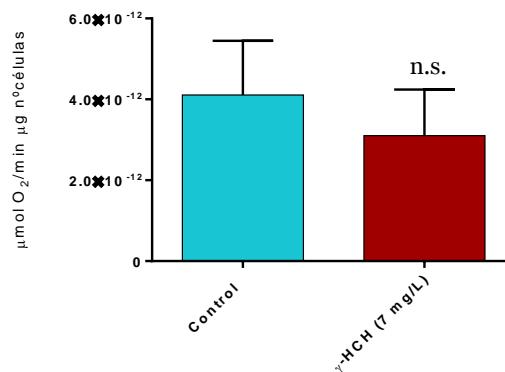


Figura 11: Efecto del γ -HCH (7 mg/L) en la capacidad de respiración de *Anabaena* PCC7120. La tasa de respiración se ha determinado en base al oxígeno consumido por la cianobacteria. Los datos se han referido al control sin lindano. El experimento se realizó con dos réplicas biológicas y tres técnicas. Las barras de error representan la desviación estándar. La significancia de la variación se determinó mediante un test estadístico t-test. n.s.: no significativo, *: significativo con un p-valor inferior a 0,05.

5.1.3. Efecto del γ -HCH sobre enzimas implicadas en la defensa al estrés oxidativo de *Anabaena* PCC7120

En base a resultados obtenidos en estudios previos, se proponía que en presencia de lindano, *Anabaena* PCC7120 podía estar sometida a estrés oxidativo (Castro et al, 2016; Abizanda et al, 2017) mediante un mecanismo molecular actualmente desconocido. Por ese motivo, en este trabajo se consideró interesante caracterizar cambios en mecanismos de defensa oxidativa en la cianobacteria. Se analizaron

las proteínas implicadas en la defensa a este tipo de estrés, tanto a través de la medición de sus actividades enzimáticas como estudiando la tasa de transcripción de los genes que las codifican.

5.1.3.1. Determinación de actividades enzimáticas en extractos crudos de *Anabaena*

5.1.3.1.1. Determinación de actividad superóxido dismutasa de extracto crudo de

Anabaena PCC7120 en presencia de γ -HCH

La enzima superóxido dismutasa cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno (McCords, 1969), siendo esencial para combatir el estrés oxidativo en las células. En *Anabaena PCC7129* una enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso y asociada a la membrana celular, codificada por el gen *sodA*, protege al aparato fotosintético de la cianobacteria del estrés oxidativo (Zhao, 2007). En este trabajo se determinó la actividad superóxido dismutasa en extractos crudos de cultivos control y cultivos en presencia de lindano a una concentración de 7 mg/L, tras 48 horas de exposición al pesticida. Los resultados se muestran en la Figura 12.

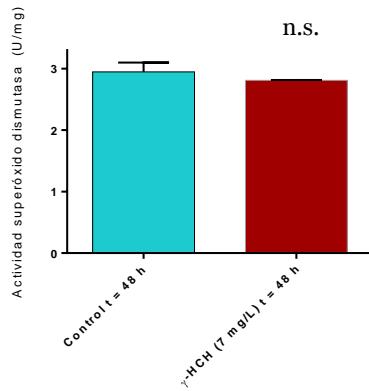


Figura 12: Cambios relativos a la actividad superóxido dismutasa de *Anabaena PCC7120* en presencia de γ -HCH (7 mg/L). El experimento se realizó con dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. Las barras de error representan la desviación estándar. La significancia de la variación se determinó mediante un test estadístico t-test. n.s.: no significativo, *: significativo con un p-valor inferior a 0,05.

En los resultados obtenidos se observa que no hay una variación significativa de la actividad superóxido dismutasa en el cultivo tratado con una concentración de 7 mg/L de lindano respecto al cultivo control tras dos días en presencia del pesticida.

5.1.3.1.2. Actividad catalasa de extracto crudo de *Anabaena PCC7120* en presencia de γ -HCH

La catalasa es una enzima perteneciente a la familia de las oxidorreductasas que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. Esta enzima, asociada a manganeso, es capaz de proteger el aparato fotosintético de *Anabaena PCC7120* del estrés oxidativo (Banerjee, 2012). Se determinó la actividad catalasa de *Anabaena PCC7120* tras 48 horas de exposición a 7 mg/L de lindano. Los resultados se muestran en la Figura 13.

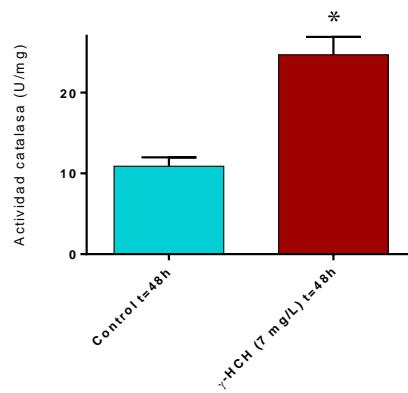
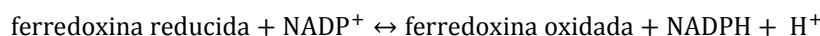


Figura 13: Cambios relativos a la actividad catalasa de *Anabaena PCC7120* en presencia de γ -HCH (7 mg/L). El experimento se realizó con dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. Las barras de error representan la desviación estándar. La significancia de la variación se determinó mediante un test estadístico t-test. n.s.: no significativo, *: significativo con un p-valor inferior a 0,05.

Los resultados obtenidos representados en la imagen 13 muestran que la actividad catalasa del cultivo en presencia de 7 mg/L de lindano aumenta más de dos veces respecto al cultivo control tras dos días en presencia del pesticida.

5.1.3.1.3. Actividad diaforasa de la FNR de extracto crudo de *Anabaena PCC7120* en presencia de γ -HCH

La ferredoxina NADP⁺ reductasa (FNR) es una enzima que cataliza la siguiente reacción en la fotosíntesis (fotorreducción de NADP⁺):



Como es capaz de transferir electrones entre el NADPH y un aceptor, se dice que posee actividad diaforasa. Se determinó la actividad diaforasa de la FNR de *Anabaena* PCC7120 tras dos días de exposición a 7 mg/L de lindano. Los resultados se muestran en la Figura 14.

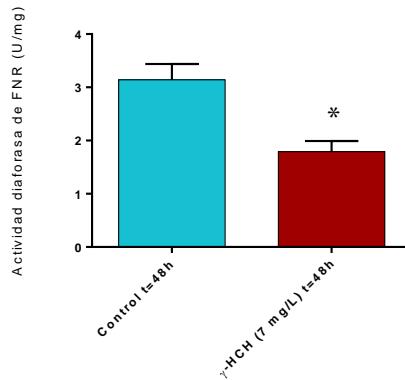


Figura 14: Cambios relativos a la actividad diaforasa de la FNR de *Anabaena* PCC7120 en presencia de γ -HCH (7 mg/L). Los datos se han referido al control sin lindano. El experimento se realizó con dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. Las barras de error representan la desviación estándar. La significancia de la variación se determinó mediante un test estadístico t-test. n.s.: no significativo, *: significativo con un p-valor inferior a 0,05.

Los resultados obtenidos, que se encuentran representados en la Figura 14, indican que se produce una disminución significativa de la actividad diaforasa de la FNR en presencia de 7 mg/L de lindano tras dos días de exposición. La disminución observada de la actividad diaforasa de la FNR tras 48 horas de exposición a lindano coincide con la observación en estudios previos de Bueno *et al* 2004 de que a las 48 horas en presencia del pesticida se produce una liberación de la FNR desde el tilacoide hasta el citoplasma, aunque en el mismo estudio se afirma que la presencia de lindano no tiene efectos significativos en la síntesis, degradación y actividad de esta enzima. Esto podría explicarse debido a que en los estudios de bueno et al (2004) se utilizó una concentración de lindano mejor, en la cepa *Anabaena* PCC7119, y que en nuestro caso, las células están más afectadas.

5.1.3.2. Estudio de la expresión génica de proteínas implicadas en la defensa al estrés oxidativo: FurA, FurB y flavodoxina mediante Western Blot

Como se ha comentado anteriormente, además de las ya mencionadas defensas enzimáticas contra el estrés oxidativo, *Anabaena* PCC7120 posee otro tipo de mecanismo defensivo basado en las proteínas Fur, que regulan un gran número de genes, además del metabolismo del hierro y del zinc. Se estudió mediante inmunodetección con la técnica de Western Blot si una concentración de 7 mg/L de lindano tenía algún efecto en la transcripción de las proteínas FurA, FurB y flavodoxina. Los resultados se muestran en la Figura 15.

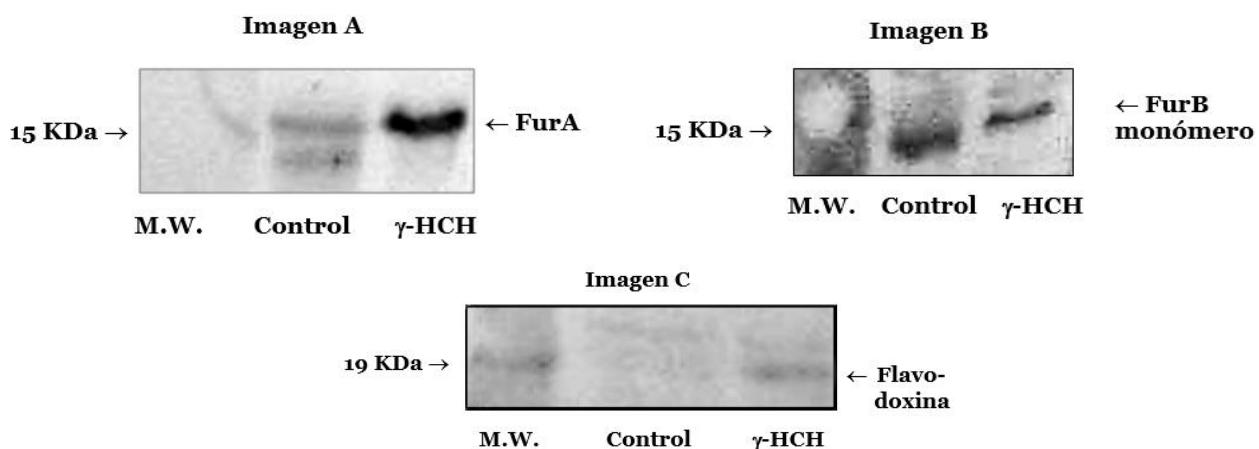


Figura 15: Análisis por “Western Blot” de la sobreexpresión de proteínas marcadoras de estrés oxidativo de *Anabaena* PCC7120 en presencia de lindano. Cada imagen posee su propio marcador de peso molecular, en el carril de la izquierda. La inmunodetección de las proteínas de interés en las muestras tratadas con lindano se han referido a un control sin el pesticida, mostrado en el carril central de cada imagen.

Los resultados obtenidos tras la inmunodetección muestran que en el caso de la proteína FurA (17,421 KDa) se puede observar que existe un incremento en su expresión en presencia de lindano (Fig. 15.A). En el caso la proteína FurB se observa una banda correspondiente a la proteína monomérica (15,116 KDa) que se observa disminuida con respecto al control (Fig. 15.B). La flavodoxina (18,832 KDa) sufre una ligera inducción en presencia del lindano (Fig. 15.C), lo que indica estrés oxidativo o deficiencia de hierro.



5.2. Respuesta transcripcional de *Anabaena PCC7120* a la presencia de γ -HCH

Como se ha descrito previamente, la presencia de 7 mg/L de lindano puede inducir una situación de estrés oxidativo en la cianobacteria *Anabaena PCC7120*. Se pretendió determinar la expresión génica de los genes que codifican las enzimas de defensa a este tipo de estrés, con el objetivo de obtener una información complementaria a la de sus actividades catalíticas en presencia de lindano. Además, se estudió la expresión génica de aquellos genes potencialmente implicados en la ruta de degradación del lindano del microorganismo.

5.2.1. Estudio de la expresión génica de genes implicados en la defensa al estrés oxidativo en *Anabaena PCC7120*

Como se ha mencionado con anterioridad, enzimas como la superóxido dismutasa o catalasa de *Anabaena PCC7120* defienden al microorganismo en situaciones de estrés oxidativo. Además de la determinación de actividades enzimáticas, se puede obtener información mediante el estudio de los transcritos de mRNA, reflejo de la inducción génica que lleva a cabo la cianobacteria en presencia de lindano. Se estudió mediante PCR a tiempo real la inducción de los genes de respuesta a estrés oxidativo *catA* (*alr0998*) y *sodA* de *Anabaena* tras 30 horas y 48 horas de exposición al γ -HCH.

5.2.1.1. Estudio de la expresión del gen *sodA* de *Anabaena PCC7120*

Se estudió la expresión del gen *sodA* de *Anabaena PCC7120*, que codifica para una enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso, tras 30 y 48 horas de exposición al lindano. Los resultados se muestran en la Figura 16.

Los datos representados en la Figura 16 muestran que la actividad SOD en presencia de 7 mg/L de lindano no presenta variaciones en la inducción génica significativas tras 30 y 48 horas de exposición. Estos datos son congruentes con los obtenidos en el apartado anterior, en el cual se determinaba que la actividad superóxido dismutasa de extracto crudo de *Anabaena PCC7120* no cambia tras 48 horas en presencia del pesticida.

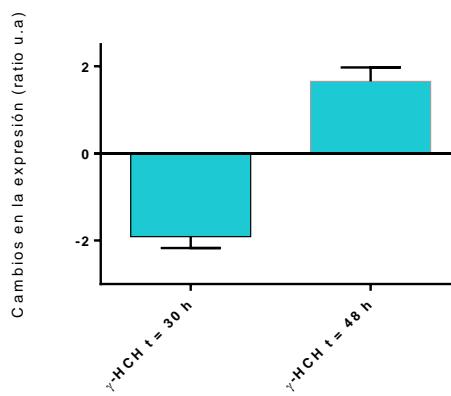


Figura 16: Cambios relativos en los niveles de transcripción del gen *sodA* de *Anabaena* PCC7120 tras 30 y 48 horas de exposición a 7 mg/L de γ-lindano. Las barras de error representan la desviación estándar. Se consideró como cambio significativo toda aquella variación mayor que ± 2 .

5.2.1.2. Estudio de la expresión del gen *catA* de *Anabaena* PCC7120

Se estudió la expresión del gen *catA* (*alr0998*), que en *Anabaena* PCC7120 codifica para una enzima catalasa dependiente de magnesio, de la cual se ha descrito que su sobreexpresión en cianobacterias aumenta la resistencia al estrés oxidativo inducido por agua oxigenada y provoca una disminución de los niveles de ROS intracelulares (Banerjee 2012). Se estudio la inducción de este gen tras 30 y 48 horas de exposición a una concentración de 7 mg/L de lindano. Los resultados se muestran en la Figura 17.

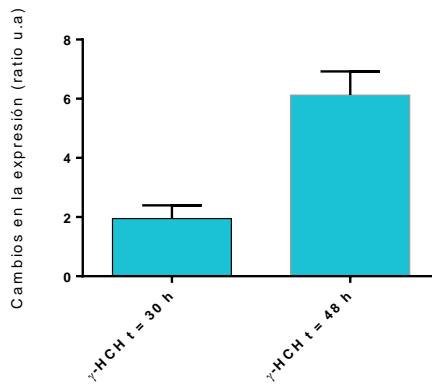


Figura 17: Cambios relativos en los niveles de transcripción del gen *catA* de *Anabaena* PCC7120 tras 30 y 48 horas de exposición a 7 mg/L. Las barras de error representan la desviación estándar. Se consideró como cambio significativo toda aquella variación mayor que ± 2 .



En los resultados obtenidos, representados en la Figura 17, se observa que el gen *catA* sufre un aumento en su expresión génica de aproximadamente 2 veces tras 30 horas en presencia de lindano y que esta inducción aumenta a 6 veces tras 48 horas de exposición.

5.2.2. Estudio de la expresión génica de genes potencialmente implicados en la ruta de degradación de γ -HCH de *Anabaena* PCC7120

Se ha demostrado en estudios previos que *Anabaena* PCC7120 es capaz de degradar el lindano (Kuritz & Wolk, 1995) pero se desconocen las bases moleculares de la utilización del compuesto. El objetivo del experimento era determinar si *Anabaena* PCC7120 degradaba el isómero γ -HCH mediante la inducción de una ruta de degradación tal y como ocurría en *S. paucimobilis*. Los genes *linB* y *linE* están potencialmente implicados en esta ruta. Se pretendía comprobar si estos genes sufren alguna inducción en presencia del compuesto. En algunos estudios, se ha descrito que la inducción génica que sufren algunos organismos degradadores de hexaclorociclohexanos, como *S. paucimobilis* presenta un pico máximo de inducción a los pocos minutos de exposición al compuesto. Por ese motivo, se decidió analizar la expresión génica de los genes *linB* y *linE* de *Anabaena* PCC7120 a distintos tiempos de análisis.

5.2.2.1. Estudio de la expresión del gen *linB*

En el experimento se estudió expresión génica del homólogo al gen *linB* de *S. paucimobilis*, que codifica para una haloalcano deshalogenasa, con intención de comprobar si este gen sufre una inducción como respuesta a la presencia de lindano. El experimento se llevó a cabo en una concentración de 7 mg/L de lindano y con unos tiempos de análisis de 30 min, 1h, 5h, 24h, 30h y 48h. Los resultados se muestran en la Figura 18.

Los resultados obtenidos, representados en las gráficas de la Figura 18, indican que el gen *linB* sufre una ligera disminución de su expresión tras una 1 h y 30 h en presencia de lindano. El resto de los tiempos analizados la expresión del gen no presenta cambios significativos. Globalmente, se puede decir que el

gen *linB* no sufre cambios significativos en su expresión en presencia de lindano. Se comprobó en un experimento paralelo que el DMSO en el cual se disuelve el lindano no tiene una afectación significativa en la inducción génica (datos no mostrados).

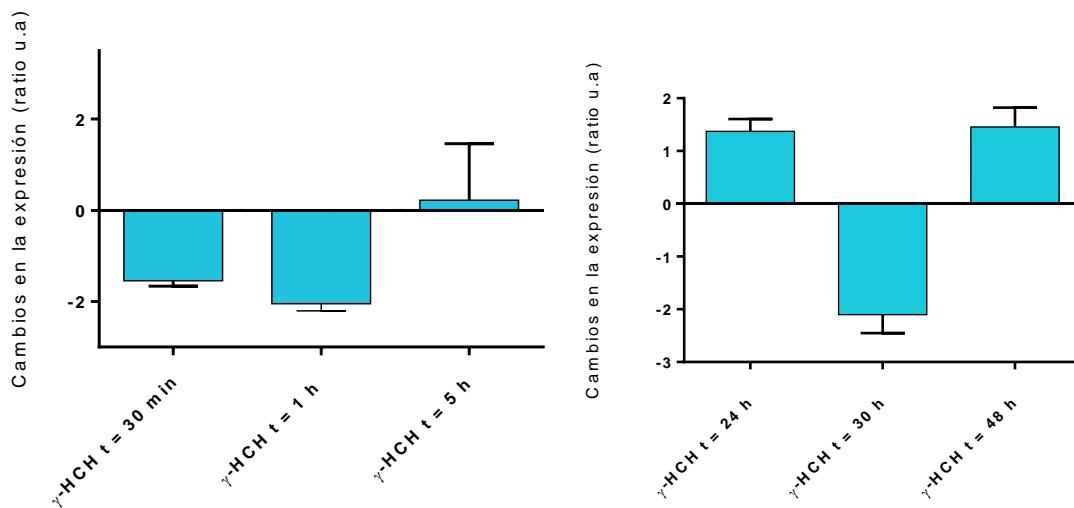


Figura 18: Cambios relativos en los niveles de transcripción del gen *linB* de *Anabaena PCC7120* como consecuencia de exposición a 7 mg/L de γ -lindano. A: Expresión del gen *linB* a tiempos cortos de análisis (30 min, 1 h y 5 h). B: Expresión del gen *linB* a tiempos largos de análisis (24 h, 30 h y 48 h). Las barras de error representan la desviación estándar. Se consideró significativo cualquier cambio en la expresión génica superior a ± 2 .

5.2.2.2. Estudio de la expresión de *linE*

Se estudió la expresión génica del homólogo al gen *linE* de *S. paucimobilis*, que codifica para una oxigenasa. El experimento se llevó a cabo en una concentración de 7 mg/L de lindano y con unos tiempos de análisis de 30 min, 1h, 5h, 24h, 30h y 48h. Los resultados se muestran en la Figura 19.

Los resultados obtenidos, representados en la Figura 19, indican que la expresión del gen *linE* se encuentra disminuida en torno a 5 veces tras 30 minutos en presencia de lindano, y disminuye a 10 veces tras 1 h en presencia del pesticida. Tras 5 y 24 horas la expresión del gen no presenta variaciones significativas, y a las 30 y 48 horas vuelve a sufrir una leve disminución de su expresión, más suave que

la inicial. Se comprobó que el DMSO en el cual se disuelve el lindano no tiene un efecto significativo en la inducción génica (datos no mostrados).

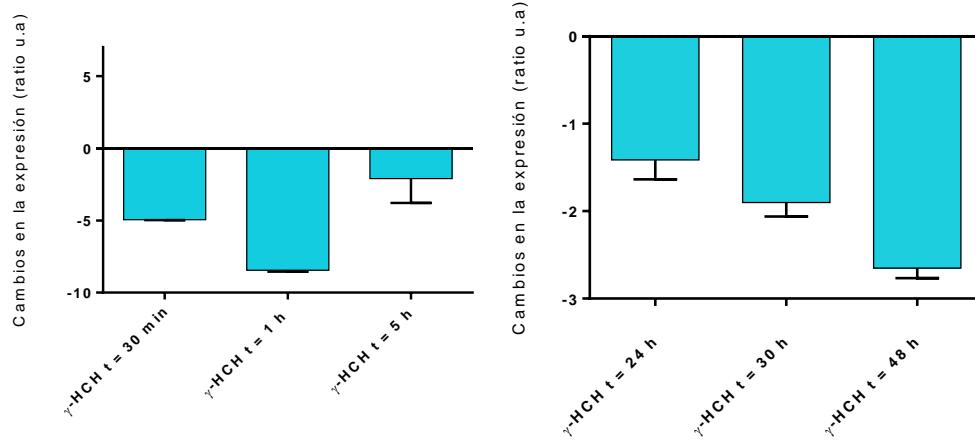


Figura 19: Cambios relativos en los niveles de transcripción del gen *linE* de *Anabaena PCC7120* como consecuencia de exposición a 7 mg/L de γ-lindano. A: Expresión del gen *linE* a tiempos cortos de análisis (30 min, 1 h y 5 h). B: Expresión del gen *linE* a tiempos largos de análisis (24 h, 30 h y 48 h). Las barras de error representan la desviación estándar. Se consideró significativo cualquier cambio en la expresión génica mayor que ±2.

5.3. Aplicación a muestras de campo

5.3.1. Estudio de la presencia de genes *linBy linE* en muestras de campo procedentes de Bailín y Sardas

Como se ha descrito con anterioridad, los genes *lin* son un conjunto de genes potencialmente implicados en la degradación de los isómeros de hexaclorociclohexanos por microorganismos como *S. paucimobilis*. En *Anabaena PCC7120*, organismo caracterizado como degradador de lindano, se han hallado unos genes homólogos a los genes *lin* que podrían cumplir la misma función. Es sabido que cuando un emplazamiento natural sufre algún tipo de contaminación, el tipo de contaminante presente tiene dos efectos directos en las poblaciones de microorganismos presentes: en primer lugar, se produce una selección natural que implica un potenciamiento del crecimiento de aquellas especies con mecanismos moleculares que les permiten incorporar el contaminante a su metabolismo, bien como fuente de carbono o bien como mecanismo de detoxificación. En segundo lugar, la presencia de un contaminante induce una adaptación de los organismos presentes que consiste en la modificación de sus rutas



moleculares, bien para detoxificar el compuesto o bien para asimilarlo (Barkay & Pritchard, 1988). En consecuencia, se buscó la presencia de estos genes en muestras procedentes tanto de Bailín como de Sardas porque su presencia implicaría la de organismos con potencial de degradación tanto de lindano como de otros compuestos de HCH.

5.3.2. Estudio de la conservación de los cebadores para la amplificación de los genes

linBy linE en muestras de campo

Para llevar a cabo la búsqueda de los genes *linBy linE* en muestras de campo se partió de unos cebadores de los genes *linB* y *linE* de la cianobacteria *Anabaena* PCC7120. Debido a la motivación y objetivos del experimento desarrollados en el apartado anterior, interesaba que la secuencia de los genes *linB* y *linE* con la que hibridaban estos cebadores estuviese lo más conservada posible entre distintas especies de cianobacterias, aunque estas estuviesen alejadas filogenéticamente. De este modo, si los organismos presentes seleccionados naturalmente eran otras cianobacterias, podrían ser detectadas. De este modo, se obtendría un conjunto de organismos con potencial degradador de hexaclorociclohexanos más amplio. Utilizando distintas herramientas informáticas como Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de NCBI, UniProt, Multiple Sequence Alignment ClustalW2 (EMBL-EBI), Jalview y bases de datos (Cyanobase) se determinó que la secuencia de los cebadores utilizados para amplificar los genes *linBy linE* de *Anabaena* PCC7120 en la PCR a tiempo real tenían un grado muy alto de alineamiento con los genes *linB* y *linE* de otras cianobacterias. Los resultados se muestran en la tabla 5, mostrada a continuación.

Gen	<i>Nodularia spumigena</i> , <i>Tolyphothrix bouteillei</i> , <i>Fischerella</i> sp. PCC9605, <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> ,
<i>linB</i>	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Calothrix</i> sp.336/3, <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002, <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843, <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803, <i>Prochlorococcus marinus</i> str. LG.
Gen	<i>Anabaena</i> PCC7120, <i>Calothrix</i> sp. PCC7507, <i>N. punctiforme</i> PCC73102, <i>Fischerella muscicola</i> , <i>Nostoc</i>
<i>linE</i>	PCC7107, <i>Leptolyngbya</i> sp. NIES-2104, <i>Aliterella atlantica</i> , <i>Synechocystis</i> sp. PCC6714.

Tabla 5: especies de cianobacterias con secuencia de los cebadores de los genes *linBy linE* altamente conservada y similares a las de *Anabaena* PCC7120.

Se muestran a continuación los alineamientos de los primers directo e inverso de *Anabaena* PCC7120

dentro de los genes *linB* y *linE* de distintas especies de cianobacterias. Se estudió la analogía y conservación de secuencia que presentan estas cianobacterias con *Anabaena* para determinar si sería posible amplificar sus genes *lin* mediante los cebadores disponibles en el laboratorio.

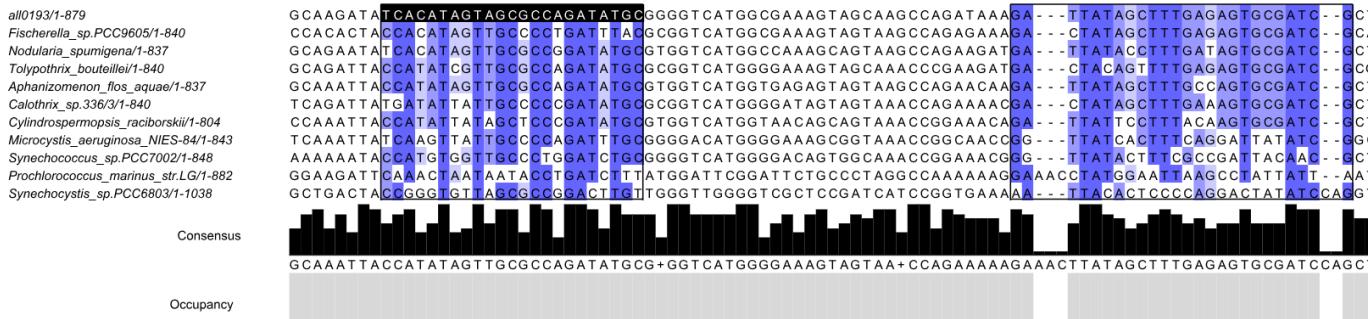


Figura 20: Alineamiento del fragmento del gen *linB* de *Anabaena* PCC7120 con el mismo fragmento del gen de otras cianobacterias indicadas a la izquierda de la Figura. El alineamiento se realizó mediante ClustalW y se representó con Jalview. Se determinan el consenso y la ocupancia de la secuencia. Las zonas coloreadas indican las secuencias del cebador directo e inverso, respectivamente, de *Anabaena* PCC7120, y el fragmento coloreado, la secuencia total del gen *linB* que amplifican.

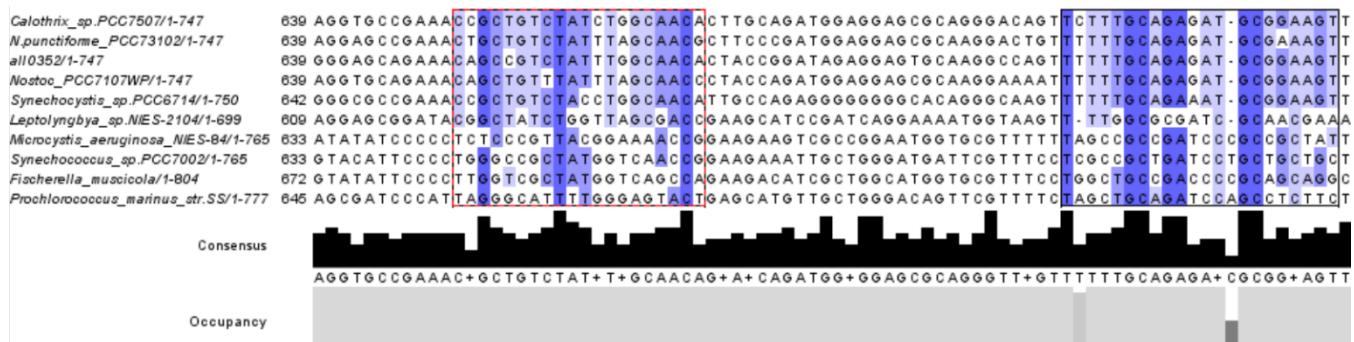


Figura 21: Alineamiento del fragmento del gen *linE* de *Anabaena* PCC7120 con el mismo fragmento del gen de otras cianobacterias indicadas a la izquierda de la Figura. El alineamiento se realizó mediante ClustalW y se representó con Jalview. Se determinan el consenso y la ocupancia de la secuencia. Las zonas coloreadas indican las secuencias del cebador directo e inverso, respectivamente, de *Anabaena* PCC7120, y el fragmento coloreado, la secuencia total del gen *linE* que amplifican.



En el alineamiento de la secuencia de nucleótidos amplificada por los cebadores de *Anabaena* PCC7120 tanto del gen *linB* como de *linE* muestran en color azul más oscuro aquellos nucleótidos que están más conservados en las distintas especies de cianobacterias. Los representados en un azul más claro representan fragmentos de secuencia que muestran más variación de una especie a otra de cianobacteria y, por lo tanto, zonas donde hay menos posibilidad de que hibride el cebador. En vista de los resultados, se observa que la secuencia amplificada por estos cebadores del gen *linB* está más conservada en las cianobacterias estudiadas que la de *linE*.

5.3.3. Estudio de la presencia de genes *linB* y *linE* en muestras procedentes de Bailín y Sardas

Partimos de 5L de muestras de agua de la balsa de tormentas de Bailín y 5L de la balsa de lixiviados de Sardás. Se aplicó el protocolo de extracción de DNA genómico a partir de muestras de campo explicado en la sección 4.4.1. de materiales y métodos y se estimó el número de copias por ml de los genes de interés en el genoma de los microorganismos presentes mediante PCR a tiempo real y una recta patrón de DNA genómico de *Anabaena* PCC7120.

Los datos se referencian a una recta patrón de DNA genómico de *Anabaena* PCC7120, de donde se extrae la cantidad de DNA del gen de interés inicial en base al número de ciclos de amplificación necesarios según la cantidad de material genético inicial. Los resultados se muestran a continuación.

5.3.3.1. Presencia del gen *linB*

El DNA aislado de las muestras permitió llevar a cabo la amplificación del gen *linB*. El resultado se encuentra representado en la Figura 22.

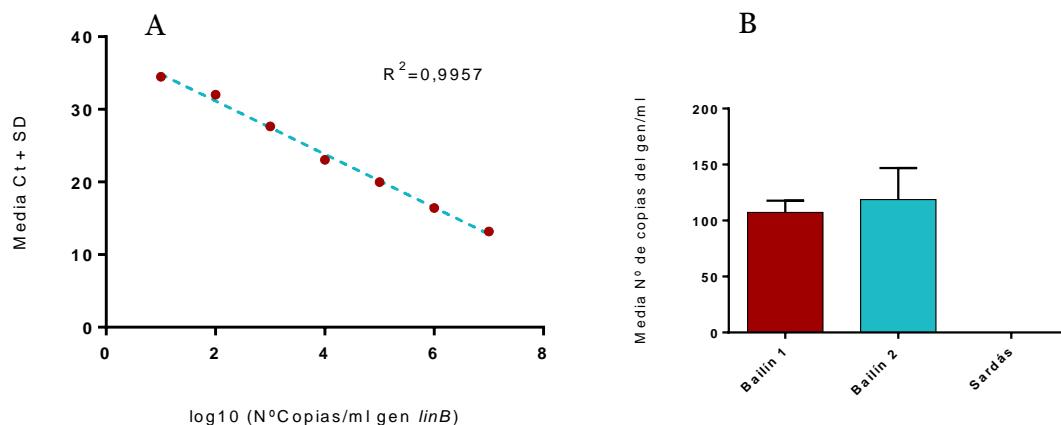


Figura 22: Número de copias de *linB* en muestras de balsas de seguridad de Bailín y Sardas. La imagen A representa la recta patrón obtenida a partir de DNA cromosómico de *Anabaena* PCC7120. La recta relaciona el número de ciclos de amplificación necesarios dependiendo de la concentración inicial de material genético de partida. De esta gráfica se extrae la concentración inicial de los genes de interés en las muestras procedentes de Bailín y Sardas en base al número de ciclos de amplificación de la PCR a tiempo real.

La imagen B representa el número de copias por mililitro del gen *linB* presentes en las muestras de campo. La barra de error representa la desviación estándar.

En los resultados obtenidos, que han sido representados en la Figura 22, se observa que en las muestras procedentes de Bailín hay aproximadamente 100 copias/ml del gen *linB*. Las dos muestras, nombradas como Bailín1 y Bailín2 proceden del mismo punto del vertedero, pero durante la extracción de DNA se decidió separar el pellet en dos alícuotas en tubos eppendorf diferentes. Una de ellas contenía más cantidad de tierra y restos orgánicos del lugar de origen de la muestra (Bailín1). Se tomó esta medida en caso de que los restos presentes influyeran negativamente en la cantidad y calidad del material genético extraído. En ambos casos se obtiene un número de copias del gen *linB* por mililitro similar, correspondiente a la presencia de alguna cianobacteria de las indicadas anteriormente, pero en una concentración bastante baja. En el caso de la muestra real procedente de Sardas, no se obtuvo amplificación del gen de interés. Este resultado puede indicar que, en el momento de la toma de muestra no había poblaciones de las cianobacterias estudiadas presentes en el agua. Sin embargo, la falta de amplificación del fragmento génico de interés no está necesariamente relacionada con la ausencia de

microorganismo potencialmente degradadores de lindano. Esta afirmación se argumenta posteriormente en Discusión.

5.3.3.2. Presencia del gen *linE*

El resultado de la amplificación del gen *linE* en las muestras de las balsas de Bailín y Sardas se encuentran representadas en la Figura 23. En este caso, se obtuvo una cantidad aproximada de 50 copias/ml del gen *linE* en las muestras procedentes de la alícuota 1 del vertedero de Bailín y unas 100 copias *linE*/ml en la alícuota 2. Por otro lado, igual que en el caso del gen *linB*, no se observa amplificación génica en la muestra procedente de Sardas.

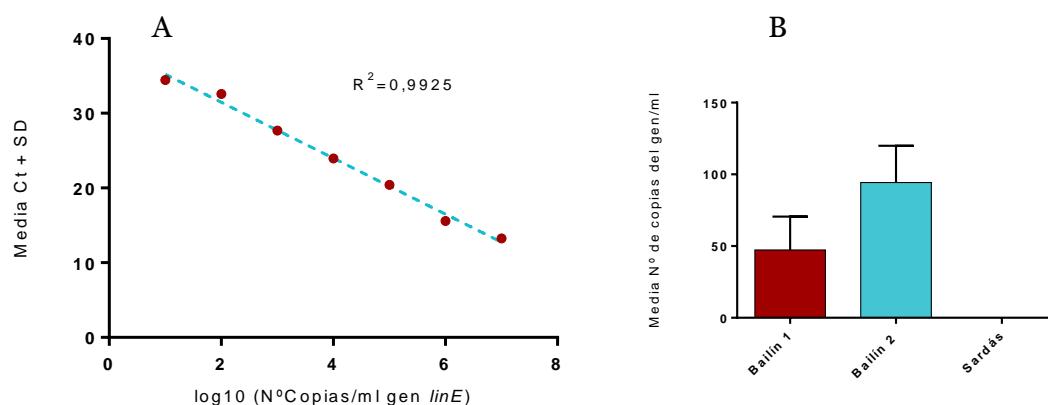


Figura 23: Número de copias de *linE* en muestras de balsas de seguridad de Bailín y Sardas La imagen A representa la recta patrón obtenida a partir de DNA cromosómico de *Anabaena* PCC7120. La recta relaciona el número de ciclos de amplificación necesarios dependiendo de la concentración inicial de material genético de partida. De esta gráfica se extrae la concentración inicial de los genes de interés en las muestras procedentes de Bailín y Sardas en base al número de ciclos de amplificación de la PCR a tiempo real. La imagen B representa el número de copias por mililitro del gen *linE* presentes en las muestras de campo. La barra de error representa la desviación estándar.

5.4. Estudios de degradación

La cianobacteria *Anabaena* PCC7120 podría consolidarse como una posible alternativa a la eliminación del lindano tanto de las balsas de tormenta y lixiviados de Bailín y Sardas, como del río Gállego u otras masas de agua afectadas. En estudios previos del laboratorio se ha determinado su capacidad de degradación en medio líquido con isómero γ -HCH (lindano) (Jorge Guío, 2018; Sara Abizanda, 2017).

Sin embargo, una de las mayores limitaciones del tratamiento de aguas contaminadas con algas o cianobacterias, es la posterior separación de los microorganismos del agua tratada. Se han propuesto algunos mecanismos que abarcan desde la filtración a través de filtros de arena y la centrifugación (Becker, 1989) hasta la autoflocculación, que consiste en potenciar la autoagregación deteniendo la aireación del cultivo y decantando a continuación (de la Noue, 1988). Esta técnica ha sido desarrollada particularmente para cianobacterias, pero es difícil de llevar a cabo en un entorno natural debido a todos los factores climáticos y físicos que implica un entorno real y no controlado. En base a estos datos, se planteó la posibilidad de inmovilizar la cianobacteria para llevar a cabo una potencial biorremediación en piscinas de cultivo, con la posibilidad de recogerlas posteriormente mediante redes o mallas sin que tuviesen una consecuencia nociva en el equilibrio del ecosistema y facilitar el manejo de la biomasa, evitando su dispersión. El método de inmovilización que se ha estudiado está basado en perlas de alginato, dentro de las cuales crecen las cianobacterias. En la Figura 24 se muestran las perlas de alginato y su proceso de fabricación.



Figura 24: Estudio de la capacidad de degradación de *Anabaena* PCC7120 en perlas de alginato como sistema de fijación. A) Imagen de las perlas de alginato junto a al cultivo de *Anabaena* PCC7120 mezclado en una proporción 1:1 con ácido algínico al 2%, previo a la gelificación y generación de las perlas. B) Imagen del proceso de fabricación de las perlas de alginato al añadirlas a una solución del 2% de cloruro sódico, que potencia la gelificación en forma de pequeñas esferas.

Se determinó la tasa de degradación de la cianobacteria midiendo la cantidad de lindano en el medio tras distintos tiempos en presencia de *Anabaena* PCC7120 inmovilizada dentro de las perlas de alginato. Los resultados se muestran en la Figura 25.

Los resultados obtenidos representados en la Figura 25 muestran que *Anabaena* PCC7120 es capaz de llevar a cabo la degradación del isómero γ -lindano de forma parcial, con una efectividad de degradación del 60% en 7 días. Este porcentaje es inferior a la tasa de degradación que presenta la cianobacteria cuando se encuentra libre en condiciones de cultivo líquido, pero ofrece numerosas ventajas a la hora de su aplicabilidad a casos de contaminación de aguas.

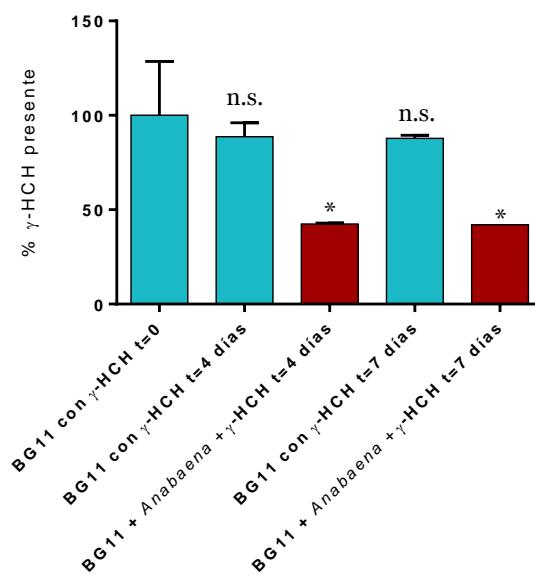


Figura 25: Estudio de la capacidad de degradación de *Anabaena* PCC7120 en perlas de alginato como sistema de fijación. A) Gráfico que muestra la degradación llevada a cabo por *Anabaena* PCC7120 fijada en perlas de alginato. El experimento se realizó con dos réplicas biológicas. Los datos de degradación para controlar fenómenos físicos como la evaporación se refirieron a un control con lindano, pero sin perlas con cianobacterias. Las barras de error representan la desviación estándar. La significancia de la variación se determinó mediante un test estadístico t-test. n.s.: no significativo, *: significativo con un p-valor inferior a 0,05.



6. Discusión de resultados

6.1. *Anabaena PCC 7120* muestra cambios morfológicos y un fenotipo de respuesta a estrés oxidativo en presencia de lindano

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que transcurrido un tiempo de exposición de 48 h al pesticida se observa la aparición de una mayor cantidad de células de tamaño superior al normal que presentan lo que parece un desplazamiento del citoplasma dentro de la membrana y una fluorescencia no uniforme. Por lo tanto, se observa que *Anabaena* PCC7120 sufre cambio en su morfología celular en presencia del lindano. Sin embargo, no se observa una afectación notable de la longitud o disposición de los filamentos que genera esta cianobacteria.

En presencia de lindano durante 48h, *Anabaena* PCC7120 no presenta cambios significativos en la tasa de fotosíntesis a 40 ni 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ de intensidad de luz, pero sí a 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, mientras que la tasa de respiración no varía significativamente, aunque se observa una tendencia a un mayor consumo de oxígeno. En estudios previos de este laboratorio (Abizanda et al, 2017) se había determinado que la cianobacteria no presenta variaciones en el crecimiento, la clorofila *a* y la concentración de carotenoides y fícobiliproteínas en presencia de lindano. Todos estos datos previos son congruentes con el hecho de que la fotosíntesis no se encuentre afectada en presencia del pesticida si tenemos en cuenta que las cianobacterias tienen, además de clorofila, otros pigmentos accesorios como fícobiliproteínas y carotenoides, que se encargan de atrapar la energía de la luz en los complejos antena de los fotosistemas (Dreckmann, 2014).

Otro punto de interés del estudio fue determinar si *Anabaena* PCC7120 experimentaba condiciones de estrés oxidativo en presencia del lindano, mediante el estudio de la expresión de defensas ante este tipo de estrés. Se determinaron tanto las actividades catalíticas superóxido dismutasa, catalasa y diaforasa de la ferredoxina NADP⁺ reductasa como la respuesta transcripcional de estas enzimas. Los resultados obtenidos indican que la actividad enzimática superóxido dismutasa de *Anabaena* PCC7120 no varía en presencia del pesticida, lo que concuerda con que su respuesta transcripcional no se ve alterada.



Por otro lado, la actividad de la enzima catalasa de *Anabaena* PCC7120 se ve aumentada en presencia de lindano, resultado que se corrobora con un aumento de la expresión del gen *catA* de más de dos veces en presencia de lindano. El hecho del aumento observado en la actividad enzimática catalasa junto con un aumento observado en estudios previos del gen *prxA* (Abizanda et al, 2017) indican que es probable que la cianobacteria se encuentre en una situación de estrés oxidativo en presencia de lindano, aunque no se observe un aumento de la actividad enzimática superóxido dismutasa.

En último lugar, la actividad diaforasa de la ferredoxina NADP⁺ reductasa disminuye en presencia de lindano, lo cual no es congruente con la no alteración de la fotosíntesis.

Por otro lado, la proteína FurA, regulador global del metabolismo del hierro y estrés oxidativo, sufre un aumento en su expresión en presencia del lindano. Ya se ha descrito anteriormente, debido al doble papel que juegan las proteínas Fur en la homeostasis del hierro y en la regulación de genes de respuesta a ROS, que algunos aspectos de la regulación del metabolismo del hierro podrían estar relacionados con el estrés oxidativo (Lee & Helmann, 2007). Sin embargo, la evidencia más clara de la relación entre ROS y regulación del hierro ha sido demostrada en estudios que caracterizaban la adaptación de cianobacterias a déficit de hierro. Muchas cianobacterias enfrentan este estrés mediante la inducción de los genes *isiA* e *isiB* (Sherman, 2007). El gen *isiB* codifica la flavodoxina, transportador de electrones capaz de sustituir la ferredoxina en deficiencia de hierro. El gen *isiA* codifica para una proteína llamada CP43', que está relacionada con un complejo de unión de clorofilas al fotosistema II. Se asocian a esta proteína funciones en deficiencia de hierro como el almacenamiento de pigmentos, la captación de luz para el fotosistema I y la disipación de energía del fotosistema II (Sherman, 2007). La proteína FurB disminuye su expresión en presencia de lindano. Todos estos resultados corroboran la afirmación anterior de que la cianobacteria *Anabaena* PCC7120 sufre estrés oxidativo en presencia del pesticida.



6.2. La expresión de los genes *linB* y *linE* no se ve inducida ni a tiempos cortos ni a tiempos largos de análisis

Se ha descrito en numerosos estudios la capacidad de la cianobacteria *Anabaena* PCC7120 de degradar el lindano y algunos isómeros de HCHs, sin embargo, la ruta de degradación no está caracterizada. Con el objetivo de determinar si esta cianobacteria metaboliza el pesticida de manera similar a la que lo hace la bacteria degradadora *S. paucimobilis*, que tiene una ruta de degradación totalmente caracterizada, se estudiaron la expresión de los genes *linB* y *linE* de *Anabaena* en presencia de lindano a distintos tiempos de análisis.

Además, el experimento tenía un segundo objetivo que era la búsqueda de un pico de inducción fuerte de alguno de los dos genes para determinar si *Anabaena* PCC7120 podría ser potencialmente utilizada para generar un biosensor que monitorizase posibles picos de contaminación en aguas generados por surgimientos de DNAPL, filtraciones, lluvias, desplazamiento de tierra, etc. Sin embargo, los resultados indicaban que el gen *linB* no sufre cambios significativos en su expresión en la mayoría de los tiempos estudiados, y que presenta una leve disminución de su transcripción tras 1 y 30 horas en presencia del pesticida. El gen *linE* por otra parte, sufre una disminución de su inducción la mayor parte de los tiempos estudiados, más significativa que la de *linB*. *Anabaena* PCC7120 presenta una diferencia notable con la expresión de estos genes en *S. paucimobilis*, ya que esta bacteria tiene una expresión constitutiva del gen *linB*, mientras que la expresión del gen *linE* es inducible (Suar et al., 2004). El hecho de que no se induzca la expresión de estos genes no implica que no participen en la ruta de degradación, ya que pueden hacerlo transcribiéndose en niveles basales.

6.3. Aplicación de *Anabaena* PCC7120 a muestras de vertederos de HCH

6.3.1. Determinación de la presencia de genes *lin*

Este ensayo se llevó a cabo para determinar si entre los organismos degradadores seleccionados por la naturaleza tras años de exposición al pesticida, se encontraban cianobacterias que ejerciesen degradación mediante la inducción de la ruta de los genes *lin*. El hecho de que no se hayan detectado



copias de estos genes en Sardas, no indica necesariamente que no habiten cianobacterias en estas aguas. En estudios previos se había determinado que las cianobacterias son comunes en lagos a lo largo de toda Europa, pero que la población de las distintas especies varía drásticamente dependiendo de la época del año y de parámetros climatológicos y ecológicos, pasando tanto por picos de máxima población como de prácticamente ausencia del microorganismo (Vaitomaa et al., 2003). También podría deberse a que el DNA amplificado estuviese dañado o degradado y que por lo tanto no hibriden los cebadores, o que estos no hibriden bien con genes *lin* de otras cianobacterias distintas a *Anabaena*. Sin embargo, en Bailín se obtiene amplificación de estos genes, lo que indica la presencia de cianobacterias con capacidad de degradación de lindano en estas aguas.

Este resultado implica que las cianobacterias son uno de los microorganismos degradadores que la naturaleza selecciona *in situ* en base al tipo de contaminación presente.

6.3.2. Degradación de lindano de *Anabaena PCC7120* inmovilizada en perlas de alginato

La cianobacteria *Anabaena PCC7120* es capaz de degradar lindano inmovilizada en el interior de perlas de alginato. La tasa de degradación alcanzada de esta forma es ligeramente inferior a la lograda por la cianobacteria en las mismas condiciones de ausencia de amonio, que como se ha mencionado previamente, inhibe la capacidad degradadora del microorganismo. La tasa alcanzada por la cianobacteria en cultivo en medio líquido y con las mismas condiciones de luz, es aproximadamente del 99% (Guío et al, 2018), mientras que la eficacia degradadora que presenta inmovilizada en perlas es del 60% aproximadamente. Respecto a este resultado, cabe resaltar, en primer lugar, aunque el porcentaje de degradación del lindano sea menor con la utilización de las perlas, el método permitiría aplicarlas a masas de agua contaminadas de forma controlada. Se plantea como posibilidad en estudios futuros aumentar el tiempo de exposición a lindano de *Anabaena* inmovilizada en perlas de alginato y determinar si la tasa de degradación aumenta. En segundo lugar, una aplicación reiterada de las cianobacterias en puntos que presentan contaminación de aguas podría resultar en un aumento de la eficacia de degradación, ya que, al no estar en medio líquido, las cianobacterias podrían retirarse y



sustituirse por cultivo nuevo, viable y sin afectaciones por la exposición continua al pesticida, aumentando el porcentaje total de lindano eliminado.

7. Conclusiones

1. *Anabaena* PCC7120 muestra cambios morfológicos y un fenotipo de respuesta a estrés oxidativo en presencia de lindano, en el que destaca la inducción de la actividad enzimática catalasa y de la proteína flavodoxina.
2. La tasa fotosintética y de respiración de la cianobacteria no se ven afectadas significativamente por la presencia de lindano a las concentraciones estudiadas. Sorprendentemente, a intensidades altas de luz ($400 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) con potencial fotooxidación la tasa fotosintética de *Anabaena* PCC7120 aumenta ligeramente.
3. La expresión de los genes *linB* y *linE* no se inducen en presencia del γ -HCH, lo cual puede indicar que la ruta de degradación no tiene lugar a través de sus productos o que las dosis o ventanas temporales no hayan sido las adecuadas.
4. La presencia de los genes *linB* y *linE* en las balsas de Bailín indican presencia de cianobacterias tolerantes al HCH.
5. *Anabaena* PCC7120 presenta una tasa de degradación del lindano del 60% tras 6 días en presencia del pesticida cuando se encuentra inmovilizada en perlas de alginato.



Referencias

- Barkay, T., & Pritchard, H. (1988). Adaptation of aquatic microbial communities to pollutant stress. *Microbiol Sci*, 5(6), 165-169.
- Becker, A. R. E. W. (1989). Technological Aspects of Mass Cultivation — A General Outline. *Handbook of Microalgal Mass Culture* (1986), 245-163.
- Bodenstein. (1972). Disposal of wastes from Lindane manufacture. E. Uhlmann, Verlag K (eds) Lindane monograph of an insecticide. *Schillinger*, 23-77.
- Bueno, M., Fillat, M.F., Strasser, R.J., Maldonado-Rodriguez, R., Marina, N., Smienk, H., Gómez-Moreno, C., Barja F. (2004). Effects of lindane on the photosynthetic apparatus of the cyanobacterium Anabaena: fluorescence induction studies and immunolocalization of ferredoxin-NADP+ reductase. *Environ Sci Pollut Res Int.*, 11(2), 98-106.
- Carolina Castro, E. S., Maria Luisa Peleato. (2016). *Study of the response to γ-lindane in cyanobacteria: transcriptional changes of genes potentially involved*. (Grado en Biotecnología), Universidad de Zaragoza, Zaguán Unizar (s.n.)
- Commission for Environmental Cooperation. North American Regional Action Plan (NARAP) on lindane and other hexachlorocyclohexane (HCH) isomers. (2006).
- Departamento de Desarrollo Rural y Sostenibilidad . Servicio de Control Ambiental. Unidad lindano. Gobierno de Aragón.. (2015). Consulta preliminar al mercado para la descontaminación del barranco de Bailín de residuos de la fabricación de lindano. Memoria descriptiva.
- Diputación general de Aragón (2016). Plan estratégico de lucha integral contra la contaminación de los residuos generados por la fabricación de lindano en Aragón. *Versión diciembre 2016*.
- de la Noue, J. & de Pauw, N.. (1988). The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotechnol Adv*, 6(4), 725-770.
- Hao Chen; Bin Gao; Shengsen Wang; June Fang. (2015). Microbial Degradation of Hexachlorocyclohexane (HCH) Pesticides. *Advances in Biodegradation and Bioremediation of Industrial Waste*, 10, 181-210.
- Fernandez, J., Arjol, M. A., & Cacho, C. (2013). POP-contaminated sites from HCH production in Sabinanigo, Spain. *Environ Sci Pollut Res Int*, 20(4), 1937-1950. doi: 10.1007/s11356-012-1433-8
- S. López-Gomollón; E. Sevilla; M.T. Bes; M. Luisa Peleato; M.F. Fillat. (2009). New insights into the role of Fur proteins: FurB (All2473) from Anabaena protects DNA and increases cell survival under oxidative stress. *Biochem Journal*, 418, 201-207.
- I. Nogués; M. Hervás; J. R. Peregrina; J. A. Navarro; M. A. de la Rosa; C. Gómez-Moreno; M. Medina. (2005). Anabaena Flavodoxin as an Electron Carrier from Photosystem I to Ferredoxin-NADP+ Reductase. Role of Flavodoxin Residues in Protein–Protein Interaction and Electron Transfer. *Biochemistry*, 44(1), 97–104.
- González, A., Bes, M.T., Barja, F., Peleato, M.L., and Fillat, M.F. (2010). Overexpression of FurA in Anabaena sp. PCC7120 reveals new targets for this regulator involved in photosynthesis, iron uptake and cellular morphology. *Plant & Cell Physiology*, 51(11), 1900-1914.
- Gorman, A. A., & Rodgers, M. A. (1992). Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments. *J Photochem Photobiol B*, 14(3), 159-176.
- Hernandez, J. A., Lopez-Gomollon, S., Muro-Pastor, A., Valladares, A., Bes, M. T., Peleato, M. L., & Fillat, M. F. (2006). Interaction of FurA from Anabaena sp. PCC 7120 with DNA: a reducing environment and the presence of Mn(2+) are positive effectors in the binding to isiB and furA promoters. *Biometals*, 19(3), 259-268. doi: 10.1007/s10534-005-7750-3
- Hernández, J. A. P., Silvia; Huang, Lionel; Peleato, M. Luisa; Fillat María F. (2007). FurA modulates gene expression of alr3808, a DpsA homologue in Nostoc (Anabaena) sp. PCC7120. *FEBS Letters*, 581(7), 1351-1356. doi: doi:10.1016/j.febslet.2007.02.053



- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol*, 57, 395-418. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090938
- Jorge Guío, E. S., M^a Luisa Peleato. (2018). *Degradación de isómeros del hexaclorociclohexano (HCH) por Anabaena PCC7120.* (Grado de Biotecnología), Universidad de Zaragoza, Zaguan Unizar.
- Krum. (1982). Lindan- ja, HCH –nein, Lindan-Workshop. *Hannover, Germany; K. Schillinger, C.I.E.L.-Redaktion (Freiburg i. Br/Germany).*
- 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. doi: doi:10.1111/j.1365-2672.1998.tb05298.x
- Kuritz, T., & Wolk, C. P. (1995). Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic pollutants. *Appl Environ Microbiol*, 61(3), 1169.
- Kurt M.Dreckmann, A. S. (2014). Biodiversity of Gracilariaeae (Rhodophyta) in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(1), 69-75.
- Raina, V.; Suar, M.; Singh, A.; Prakash, O.; Dadhwal, M.; Gupta. S.K.; Dogra, C.; Lawlor, K.; Lal S; van der Meer, J.R.; Holliger, C., Lal (2007). Enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) in contaminated soils via inoculation with *Sphingobium indicum* B90A. *Biodegradation*, 19(1), 27-40.
- Latifi, A., Ruiz, M., & Zhang, C. C. (2009). Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 33(2), 258-278. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00134.x
- Lee, J. W., & Helmann, J. D. (2007). Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals*, 20(3-4), 485-499. doi: 10.1007/s10534-006-9070-7
- K. Nolan; J. Kamrath; J. Levitt. (2012). Lindane Toxicity: A Comprehensive Review of the Medical Literature. *Pediatric Dermatology*, 29(2), 141-146. doi: doi:10.1111/j.1525-1470.2011.01519.x
- Li. (1999). Global technical hexachlorocyclohexane usage and its contamination consequences in the environment: from 1948 to 1997. *Sci Total Environ*, 232(3), 121–158.
- William W. Mohn; Birgit Mertens; Josh D. Neufeld; Willy Verstraete; Victor de Lorenzo (2006). Distribution and phylogeny of hexachlorocyclohexane-degrading bacteria in soils from Spain. *Environmental Microbiology*, 8(1), 60-68.
- M. Ausubel, R.E. Kingston, D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. (2000). Current protocols in molecular biology. *Molecular Reproduction and Development*, 1(2), 146-146. doi: doi:10.1002/mrd.1080010210
- Manisha Banerjee , A. B., Shree Kumar Apte. (2012). Mn-catalase (Alr0998) protects the photosynthetic, nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* PCC7129 from oxidative stress. *Environmental Microbiology*, 14(11).
- McCords, J. M. F., Irwin. (1969). Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244 (22), 6049-6065.
- Nagata, Y., Miyauchi, K., & Takagi, M. (1999). Complete analysis of genes and enzymes for γ -hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(4), 380-390. doi: 10.1038/sj.jim.2900736
- Naseer Sangwan, P. L., Vatsala Dwivedi, Amit Singh, Neha Niharika, Jasvinder Kaur, Shailly Anand, Jaya Malhotra, Swati Jindal, Aeshna Nigam, Devi Lal, Ankita Dua, Anjali Saxena, Nidhi Garg, Mansi Verma, Jaspreet Kaur, Udita Mukherjee, Jack A. Gilbert, Scot E. Dowd, Rajagopal Raman, Paramjit Khurana, Jitendra P. Khurana, Rup Lal (2012). Comparative Metagenomic Analysis of Soil Microbial Communities across Three Hexachlorocyclohexane Contamination Levels. *PLoS ONE*, 7(9).
- J. M. Matesanz Martín; F. J. Lanaja del Busto; J. S. Urieta Navarro (2013). Inquinosa y los lindanos de Sabiñánigo Un ejemplo de mala gestión ambiental y empresarial. *Odón: revista de divulgación del medio natural*, 4, 18-23.
- Neilan, B. A., Dittmann, E., Rouhiainen, L., Bass, R. A., Schaub, V., Sivonen, K., & Börner, T. . (1999). Nonribosomal Peptide Synthesis and Toxicogenicity of Cyanobacteria. *J Bacteriol*, 181 (13), 4089–4097.



- Pesticide Action Network North America (P.A.N.N.A.) (2008). Annex F Submission for Lindane to the POPs Reviewing Committee.
- R. Rippka, J. D., John B. Waterbury, Michael Herdman, Roger Y. Stanier. (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111(Taxonomy), 1-61.
- Rivera, K. T. B. L. V. (1997). Dechlorination of lindane by the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120 depends on the function of the nir operon. *J Bacteriol*, 179(10), 3368-3370.
- Roland F. Beers, J. a. I. W. S. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem*, 195, 133-.
- Sara Abizanda, E. S., M^a Luísa Peleato. (2017). *Lindane isomers degradation*. (Grado en Biotecnología), Universidad de Zaragoza, Zaguán Unizar. (s.n.)
- Sc John Vijgen; P. C. Abhilash; Yi Fan Li; Rup Lal; Martin Forter; Joao Torres; Nandita Singh; Mohammad Yunus; Chongguo Tian; Andreas Schäffer; Roland Weber (2011). Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs—a global perspective on the management of Lindane and its waste. *Environ Sci Pollut Res Int*, 18, 152–162.
- Sein-Echaluce VC, G. A., Napolitano M, Luque I, Barja F, Peleato ML, Fillat MF. (2015). Zur (FurB) is a key factor in the control of the oxidative stress response in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Environ Microbiol*, 17(6), 2006-2017.
- Sherman, S. (2007). Reflections on the function of IsiA, a cyanobacterial stress-inducible, Chl-binding protein. *Photosynth Res*, 93(1-3), 17-25.
- Suar, M., van der Meer, J. R., Lawlor, K., Holliger, C., & Lal, R. (2004). Dynamics of multiple lin gene expression in *Sphingomonas paucimobilis* B90A in response to different hexachlorocyclohexane isomers. *Appl Environ Microbiol*, 70(11), 6650-6656. doi: 10.1128/AEM.70.11.6650-6656.2004
- Treger. (2004). Data on production of HCH in the former USSR. *FSUE Research Institute "Sintez", Moscow*.
- Y. Nagata; R. Endo; M. Ito; Y. Ohtsubo; M. Tsuda. (2007). Aerobic degradation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76, 741–752.
- Vaitomaa, J., Rantala, A., Halinen, K., Rouhiainen, L., Tallberg, P., Mokelke, L., & Sivonen, K. (2003). Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase e copy numbers for microcystis and anabaena in lakes. *Appl Environ Microbiol*, 69(12), 7289-7297.
- Wada, K. S. H. (1989). Isolation and identification of an aerobic γ -HCH-decomposing bacterium from soil. *Soil Science and Plant Nutrition*, 35(1), 79-87.
- Walker K, V. D., Lewis RG. (1999). Factors influencing the distribution of Lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment. *Environ Sci Technol*, 33, 4373–4378.
- Weixing Zhao, Q. G., Jindong Zhao. (2007). A membrane-associated Mn-Superoxide Dismutase protects the photosynthetic apparatus and Nitrogenase from oxidative damage in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant and Cell Physiology*, 48(4), 563–572.
- Willet KL, U. E., Hites RA. (1998). Differential toxicity and environmental facts of hexachlorocyclohexane isomers. *Environ Sci Technol*, 32, 2197–2207.
- Zhao, W., Guo, Q., & Zhao, J. (2007). A membrane-associated Mn-superoxide dismutase protects the photosynthetic apparatus and nitrogenase from oxidative damage in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant Cell Physiol*, 48(4), 563-572. doi: 10.1093/pcp/pcm025

8. Material complementario

8.1. Ruta de degradación en *Sphingomonas paucimobilis*

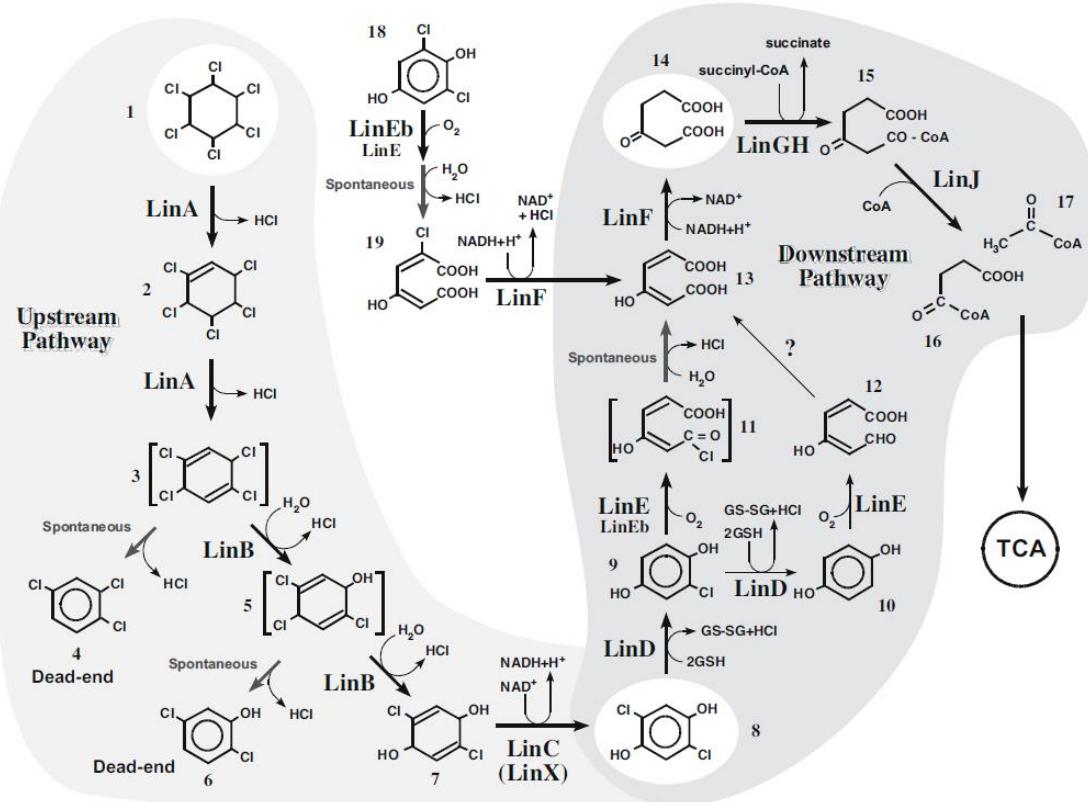


Figura 1: Esquema de la ruta de degradación del lindano en *Sphingomonas paucimobilis* (Tsuda, 2007).

8.2. Estrés oxidativo en cianobacterias. Ampliación

El oxígeno molecular por sí mismo, no es capaz de oxidar el DNA ni las proteínas, pero a través de la adquisición de electrones, se transforma en especies reactivas de oxígeno (ROS), que resultan dañinas para la mayoría de los seres vivos aeróbicos. Estas especies tienen distintas reactividades, niveles de toxicidad y dianas. Algunas de las más importantes son las siguientes:

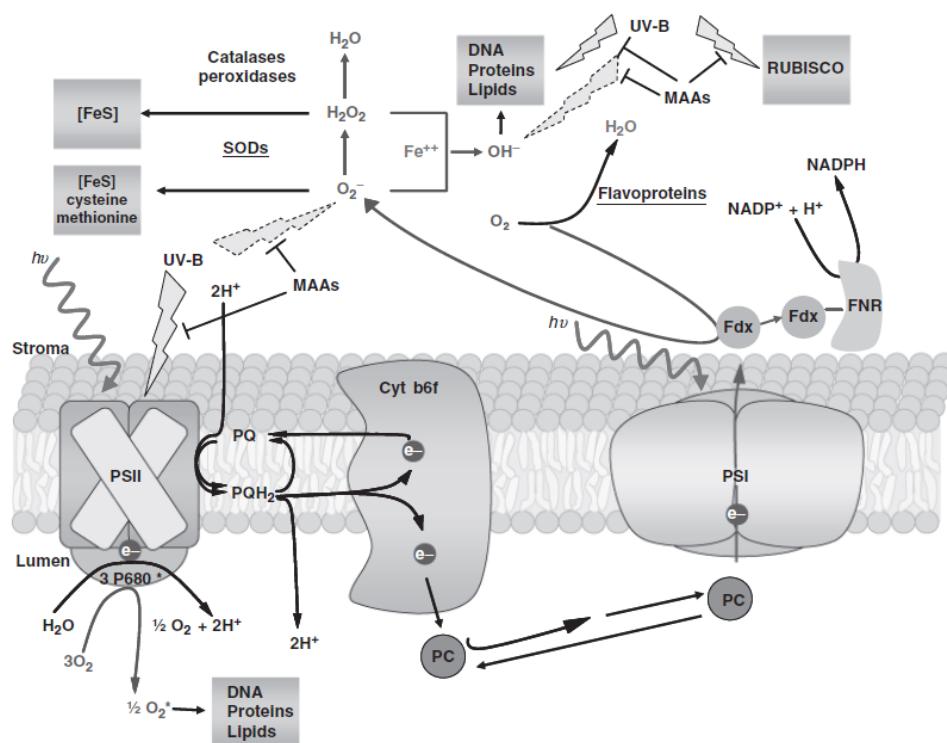
$^1\text{O}_2$, O_2^- , H_2O_2 y OH . El oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) se produce por un aporte de energía al oxígeno, es altamente reactivo, tiene una vida media corta dentro de las células (Gorman & Rodgers, 1992) y reacciona principalmente con proteínas, pigmentos y lípidos.



Tanto el anión superóxido (O_2^-) como el radical hidroxilo (OH) tienen un electrón desapareado que los hace altamente reactivos con las biomoléculas. Como el O_2^- está cargado negativamente, no difunde a través de las membranas. Oxida los grupos $[4Fe-4S]^{2+}$ a $[3Fe-4S]^{1+}$ liberando hierro (Fe^{2+}). El radical hidroxilo (OH) es muy reactivo: su velocidad de reacción se encuentra limitada por la de difusión. Es un agente mutagénico, ya que el DNA es diana directa. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no es tan reactivo como el OH, pero mediante la reacción de Fenton puede reducirse a radical hidroxilo y generar grandes daños.



Tanto el O_2^- como el H_2O_2 son considerados agentes mutagénicos, ya que liberan el hierro que desencadena la reacción de Fenton y genera radical hidroxilo que genera grandes daños en el DNA (Imlay, 2003). Las defensas que han desarrollado los seres vivos para defenderse de los daños generados por los ROS son tanto de carácter enzimático (catalasas, superóxido dismutasas (SOD) y peroxidases) como no enzimático (glutation, vitaminas A, C, E, carotenoides, etc.).



(Latifi et al., 2009)

Figura 2: Producción y dianas de ROS. El O_2 molecular (no reactivo) conduce a la formación de especies químicamente reactivas (ROS): en el fotosistema II (PSII), se produce oxígeno singlete (1O_2) por el aporte de energía al oxígeno de la clorofila fotosensibilizada.

En el fotosistema I (PSI), la reducción de O_2 utilizando electrones de PSII genera radicales de anión superóxido (O_2^-). El O_2^- es transformado en H_2O_2 y O_2 por la enzima SOD, y el H_2O_2 se reduce a agua mediante la acción de catalasas y peroxidásas. En cianobacterias, la reducción de O_2 mediante flavoproteínas de tipo A genera agua. La reducción de H_2O_2 mediante la reacción de Fenton genera el radical de hidroxilo (OH^-), altamente tóxico.



8.3. Programa de la PCR a tiempo real y procedimiento matemático utilizado para determinar cambios 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*.



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

CEBADOR	SECUENCIAS 5' → 3'	SECUENCIA AMPLIFICADA
rpnB for	AGCGGAACTGGTAAAAGACCAA	Gen <i>rpnB</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
rpnB rev	GAGAGGTACTGGCTCGGTAAACC	Gen <i>rpnB</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
linB for	CGATCGCACTCTCAAAGCTATAATC	Gen <i>linB</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
linB rev	TCACATAGTAGGCCAGATATGC	Gen <i>linB</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
linE for	ACTTCCGCATCTCTGCAAAAAA	Gen <i>linE</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
linE rev	CAGCCGTCTATTGGCAACA	Gen <i>linE</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
sodA for	CTAACCAAACCCAACCACTACCA	Gen <i>sodA</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
sodA rev	CCTTGCGAGTTTGAAGAGTT	Gen <i>sodA</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
catA for	ACCCACGGGATGTCATTATGA	Gen <i>catA</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
catA rev	TGGCAACGCACCTAACCA	Gen <i>catA</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120

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