

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular



***Análisis transcripcional de la expresión de genes
implicados en la síntesis de la cianotoxina
microcistina como respuesta a lindano***

Memoria presentada por
Laura Ceballos Laita
Licenciada en Bioquímica, para optar al título de
Máster en Biología Molecular y Celular
por la Universidad de Zaragoza

Julio 2012

MARÍA LUISA PELEATO SÁNCHEZ y LAURA CALVO BEGUERÍA

CERTIFICAN:

Que el proyecto fin de Máster “Análisis transcripcional de la expresión de genes implicados en la síntesis de la cianotoxina microcistina como respuesta a lindano”, ha sido realizada por la licenciada LAURA CEBALLOS LAITA en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, bajo su dirección y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al título de Máster en Biología Molecular y Celular.

Zaragoza, julio de 2012

Fdo: María Luisa Peleato Sánchez

Fdo: Laura Calvo Beguería

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las cianobacterias.	9
1.1.1. Las cianobacterias pueden producir toxinas.	9
1.1.1.1. Microcistinas.	10
1.1.1.2. Genes implicados en la toxicidad.	11
1.1.1.2.1. El operon <i>mcy</i> .	11
1.1.1.3. Ntca, regulador global del metabolismo del nitrógeno.	12
1.1.1.4. La familia Fur (Ferric Uptake Regulator).	12
1.1.2. La calidad del agua.	12
1.1.3. Panorama actual en España.	13
1.1.4. Problemática de los contaminantes emergentes.	14
1.1.4.1. Lindano.	15
1.1.4.2. Fármacos en las aguas.	17
 1.2. OBJETIVOS DEL PROYECTO	 19

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Estirpe utilizada.	21
2.2. Condiciones de cultivo.	21
2.2.1. Cultivo de <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 en presencia de lindano	22
2.2.2. Cultivo de <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 en presencia de otros contaminantes emergentes: paracetamol, ibuprofeno, atenolol, volarén y benceno.	23
2.3. Contaje de células.	23
2.4. Determinación del contenido de clorofila <i>a</i> .	23
2.5. Determinación de carotenoides.	23
2.6. Determinación de ficobiliproteínas.	23
2.7. Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno.	24
2.8. Extracción de microcistina-LR de cultivos de <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806.	24
2.8.1. Ensayo de inhibición enzimática de la proteína fosfatasa 2A.	25
2.9. Microscopio óptico.	25
2.10. Aislamiento de RNA total de <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806.	25
2.10.1. Precauciones.	25
2.10.2. Toma de muestra.	26
2.10.3. Extracción de RNA total de <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806.	26
2.11. Electroforesis no desnaturante del RNA.	27
2.12. Determinación de la concentración de RNA.	27
2.13. Control negativo de la presencia de DNA.	28
2.14. Retrotranscripción del RNA a cDNA mediante transcriptasa inversa (RT-PCR).	28
2.15. Estudio de amplificación del fragmento del gen <i>rrs</i> y otros genes de interés.	28
2.16. Normalización de las muestras de cDNA de diferentes condiciones de cultivo.	29
2.17. Semicuantificación de los fragmentos de los genes: <i>mcyD</i> , <i>mcyH</i> , <i>mcyJ</i> , <i>ntcA</i> , <i>furA</i> , <i>furB</i> , <i>furC</i> y <i>afurA</i> .	29

3. RESULTADOS

3.1. Estudio del efecto del lindano en <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806.	31
---	----

3.1.1. Curva de tolerancia a lindano.	31
3.2. Estudio del efecto de 10 mg/l de lindano en presencia de etanol.	31
3.2.1. Curva de crecimiento.	32
3.2.1.1. Medida de la absorbancia a 700 nm.	32
3.2.1.2. Medida de la cantidad de clorofila α .	32
3.2.1.3. Recuento de número de células.	33
3.2.2. Cambios morfológicos visualizables al microscopio óptico	33
3.2.3. RT-PCR. Puesta a punto y estudio de la fase exponencial de amplificación	34
3.2.3.1. RT-PCR: Estandarización	34
3.2.3.1.1. Determinación de la fase exponencial de la amplificación del housekeeping	35
3.2.3.2. Expresión de genes del operon <i>mcy</i>	35
3.2.3.2.1. Estudio de <i>mcyD</i> como respuesta a lindano	35
3.2.3.2.1.1. Fase exponencial de amplificación del gen <i>mcyD</i>	35
3.2.3.2.1.2. Expresión de <i>mcyD</i> como respuesta a lindano	36
3.2.3.2.2. Expresión de <i>mcyH</i> como respuesta a lindano	36
3.2.3.2.3. Expresión de <i>mcyJ</i> como respuesta a lindano	37
3.2.3.3. Expresión de genes de reguladores transcripcionales del operon <i>mcy</i>	37
3.2.3.3.1. Expresión de <i>ntcA</i> como respuesta a lindano	37
3.2.3.3.2. Expresión de <i>fur</i> como respuesta a lindano	38
3.2.4. Cuantificación de los niveles de microcistina	39
3.3. Efecto del lindano en solución acuosa	40
3.3.1. Efecto del lindano sobre parámetros fisiológicos	41
3.3.1.1. Efecto sobre los carotenoides	41
3.3.1.2. Efecto sobre las ficobiliproteínas	42
3.3.1.3. Producción de radicales libres de oxígeno	42
3.3.2. Efecto del lindano sobre la expresión de algunos genes del operon <i>mcy</i>	43
3.3.2.1. Expresión de <i>mcyD</i> como respuesta a lindano	43
3.3.2.2. Expresión de <i>mcyH</i> como respuesta a lindano	43
3.3.2.3. Expresión de <i>mcyJ</i> como respuesta a lindano	44
3.3.2.4. Expresión de <i>ntcA</i> como respuesta a de lindano	44
3.3.3. Cuantificación de los niveles de microcistina	44
3.4. Efecto de otros contaminantes emergentes sobre los niveles de microcistina en <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806	45
3.4.1. Efecto del benceno	46
3.4.1.1. Medida de la cantidad de clorofila α	46
3.4.1.2. Medida de la cantidad de microcistina	46
3.4.2. Efecto de distintos fármacos	47
3.4.2.1. Paracetamol	47
3.4.2.1.1. Medida de la cantidad de clorofila α	47
3.4.2.1.2. Medida de la cantidad de microcistina	47
3.4.2.2. Ibuprofeno, Atenolol y Voltarén	48
3.4.2.2.1. Medida de la cantidad de clorofila α	48
3.4.2.2.2. Medida de la cantidad de microcistina	48
4. DISCUSIÓN	51
5. CONCLUSIONES	55
6. BIBLIOGRAFÍA	57

ABREVIATURAS

<i>aa</i>	<i>Aminoácido</i>
<i>ABC</i>	<i>ATP binding cassette</i>
<i>Abs</i>	<i>Absorbancia</i>
<i>ATP</i>	<i>Trifosfato de adenosina</i>
<i>cm</i>	<i>Centímetro</i>
<i>CO₂</i>	<i>Dióxido de carbono</i>
<i>Da</i>	<i>Dalton</i>
<i>DEPC</i>	<i>Dietilpirocarbonato</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido desoxirribonucleótido</i>
<i>DNase I</i>	<i>Desoxirribonucleasa I</i>
<i>dNTPs</i>	<i>Mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos</i>
<i>D.O</i>	<i>Densidad óptica</i>
<i>DTT</i>	<i>1,4-ditiotreitol</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ácido etilendiaminotetraacético</i>
<i>g</i>	<i>Gramo</i>
<i>h</i>	<i>Hora</i>
<i>IgG</i>	<i>Inmunoglobulina clase G</i>
<i>kb</i>	<i>Kilobase</i>
<i>kDa</i>	<i>Kilodalton</i>
<i>l</i>	<i>Litro</i>
<i>m</i>	<i>Metro</i>
<i>M</i>	<i>Concentración molar</i>
<i>mA</i>	<i>Miliamperios</i>
<i>MC</i>	<i>Microcistina</i>
<i>mg</i>	<i>Miligramos</i>
<i>min</i>	<i>Minuto</i>
<i>ml</i>	<i>Mililitro</i>
<i>mM</i>	<i>Milimolar</i>
<i>mRNA</i>	<i>RNA mensajero</i>
<i>ng</i>	<i>Nanogramo</i>
<i>nm</i>	<i>Nanómetro</i>
<i>NRPS</i>	<i>Non-Ribosomal Peptide Synthetase (Péptido sintetasa no ribosomal)</i>
<i>O₂</i>	<i>Oxígeno</i>
<i>°C</i>	<i>Grado centígrado</i>
<i>pb</i>	<i>Pares de bases</i>
<i>PCC</i>	<i>Colección de Cultivos del Instituto Pasteur</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)</i>
<i>PKS</i>	<i>Polyketide synthase (Policétido sintasa)</i>
<i>PM/MW</i>	<i>Peso molecular / Molecular weight</i>
<i>PP1</i>	<i>Protein-fosfatasa 1</i>
<i>PP2A</i>	<i>Protein-fosfatasa 2A</i>
<i>RNA</i>	<i>Ácido ribonucleico</i>
<i>RNase</i>	<i>Ribonucleasa</i>
<i>rpm</i>	<i>Revoluciones por minuto</i>
<i>rRNA</i>	<i>RNA ribosómico</i>
<i>RT-PCR</i>	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
<i>s</i>	<i>Segundo</i>
<i>Tris</i>	<i>Tris-hidroximetil-aminoetano</i>
<i>V</i>	<i>Voltios</i>
<i>v/v</i>	<i>Relación volumen / volumen</i>

α -mRNA	RNA antisentido
ϵ	Coeficiente de extinción
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μM	Micromolar

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El incremento del impacto humano sobre las aguas de nuestro planeta, está modificando fuertemente la disponibilidad de agua de calidad para amplios grupos de la población mundial. Las cianobacterias del fitoplancton juegan un papel muy relevante en la preservación de la calidad de las aguas (degradación de compuestos, reciclado de nutrientes...) pero además, algunos grupos de estos organismos pueden producir toxinas que provocan serios problemas de salud pública y ambiental. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el posible impacto de un pesticida, el lindano, sobre la producción de una de las cianotoxinas más ubicuas y abundantes, la microcistina.

1.1. Las cianobacterias

Las cianobacterias son uno de los grupos de procariotas con mayor complejidad morfológica y diversidad fisiológica. Las primeras formas unicelulares de cianobacterias se remontan a hace más de 3500 millones de años. Su papel en el desarrollo de la vida terrestre ha sido fundamental. Desarrollaron la fotosíntesis oxigénica, que utiliza el H₂O como donador final de electrones liberando oxígeno, a diferencia del resto de bacterias fotosintéticas que utilizan otros compuestos orgánicos reducidos. Esta capacidad de fotólisis del agua pudo resultar decisiva en la evolución de la vida en la tierra, pues la acumulación de O₂ desprendido posibilitó la aparición de una atmósfera aerobia semejante a la actual. Además, parecen ser los precursores de los cloroplastos ya que poseen un aparato fotosintético estructural y funcionalmente similar, localizado en los tilacoides.

Los tilacoides, por tanto, representan las estructuras básicas necesarias para llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica. Se trata de sáculos membranosos donde se asientan los fotosistemas; contienen clorofila *a*, carotenoides (pigmentos de carácter fotoprotector), los centros de reacción fotosintéticos y el sistema de transporte electrónico. Una característica que diferencia a las cianobacterias del resto de los organismos fotosintéticos es que poseen unos complejos antena capaces de captar longitudes de onda que otros organismos no utilizan, los ficobilisomas. Son complejos proteicos exclusivos de las cianobacterias y algas rojas, que se disponen sobre la membrana del tilacoide. En ellos se encuentran pigmentos como la aloficocianina, la ficoeritrina y la ficocianina, proteína azulada que junto a la clorofila *a* dan a las cianobacterias su coloración verde azulada. Están asociados al fotosistema II.

1.1.1. Las cianobacterias pueden producir toxinas

Algunos géneros de cianobacterias producen metabolitos secundarios que resultan tóxicos para el ser humano y otros seres vivos. La gestión de recursos hídricos de forma integral y sostenible es uno de los grandes retos actuales. Una forma frecuente de contaminación en ecosistemas acuáticos es el enriquecimiento excesivo de nutrientes, conocido como eutrofización (eutrofo en griego: bien nutrido). Cuando este fenómeno ocurre naturalmente es un proceso lento, que puede durar hasta cientos de años y forma parte de la transformación general del lago en pantano y finalmente en prado. Esto ocurre porque los nutrientes introducidos masivamente en el sistema generan una gran biomasa de organismos, de vida generalmente efímera, que al morir se acumulan sobre el fondo y no son totalmente consumidos por los organismos degradadores.

Con la intervención antrópica, este fenómeno se acelera drásticamente. La eutrofización está íntimamente asociada con la proliferación incontrolada de fitoplancton, o "Bloom". Los blooms causan graves impactos en un ecosistema y en la salud humana, además, en muchas ocasiones, resultan tóxicos, debido a la presencia de cianotoxinas [1].

La primera descripción científica de envenenamiento por cianobacterias fue publicada por George Francis en "*Nature*" en 1878 [2]. En el artículo se informaba de la muerte de ganado en el río Murray (Australia) debido a la ingesta de agua con presencia de blooms de *Nodularia spumigena*.

Desde entonces se ha confirmado la capacidad de muchos géneros de cianobacterias de producir toxinas, conocidas con el nombre de cianotoxinas.

Las cianotoxinas pueden clasificarse en función de su estructura química:

- Péptidos cíclicos: microcistina y nodularina.
- Alcaloides: anatoxina-a, saxitoxina, cilindrospermopsina, aplisiatoxina y lingbiatoxina-a.
- Lipopolisacáridos.

Sin embargo, suelen agruparse según el efecto que causan, dando lugar a cuatro grupos: neurotoxinas, citotoxinas, dermatotoxinas y hepatotoxinas, siendo los más abundantes las neurotoxinas y la hepatotoxinas.

1.1.1.1. Microcistinas

Son el grupo de cianotoxinas más importantes debido a su abundancia y ubicuidad en los blooms de cianobacterias en aguas dulces y salobres, y el riesgo que conlleva la exposición crónica. Se trata de heptapéptidos cíclicos de síntesis no ribosomal, producidos por los géneros *Microcystis*; [3] [4], (de donde reciben su nombre por ser la primera bacteria en la que se detectaron) [5]; *Anabaena* [6]; [7], *Nostoc* [8], *Anabaenopsis* [9] y *Hapalosiphon* [10].

Están constituidos por aminoácidos proteicos y no proteicos (-D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha-).

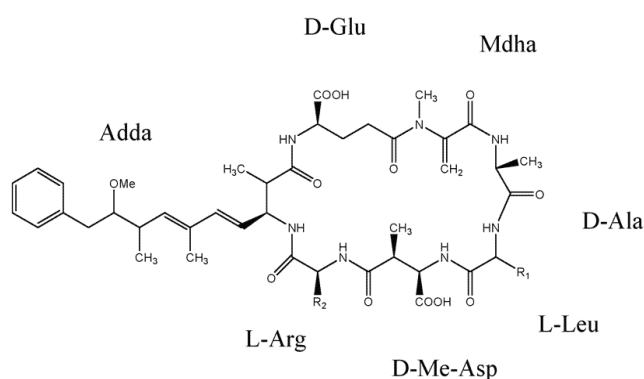


Figura 1. Variante de la cianotoxina microcistina-LR.

Se conocen casi 100 isoformas originadas por sustitución de los L-aminoácidos en las posiciones 2 y 4, y por desmetilaciones de los aminoácidos en posiciones 3 y/o 7 [11]; [12]. La más abundante es la microcistina-LR que presenta la pareja de aminoácidos LR (leucina y arginina) en las posiciones 2 y 4.

Son hepatotoxinas, ya que afectan al hígado provocando la retracción de los hepatocitos. Al separarse los hepatocitos, las células que forman los capilares sinusoidales del hígado se separan también y se produce hemorragia y fallo hepático [13]. La especificidad de las microcistinas por el hígado se debe al uso del sistema de transporte activo de las sales biliares, localizado en los hepatocitos, para acceder al interior celular.

El mecanismo molecular que subyace es la inhibición de las serín-treonín fosfatasas tipo 1 y 2A de eucariotas [14]; [15]; [16]; [17], con lo que evitan la desfosforilación, alterando el equilibrio y favoreciendo la excesiva fosforilación de proteínas. Es la hiperfosforilación de los filamentos del citoesqueleto lo que desencadena finalmente el fallo hepático. Por otra parte, las fosfatasas están implicadas en la regulación de la división celular, por lo que su inhibición puede alterar el ciclo celular.

Hay estudios que indican que dosis crónicas de microcistina o nodularina favorecen el desarrollo tumoral, por lo que pueden considerarse sustancias procancerígenas [13]; [18]; [19].

El aminoácido Adda, y el grupo carbonilo del D-Glu, que son los responsables de la toxicidad de la molécula [20]. La flexibilidad del grupo Adda le permite ocupar el bolsillo hidrofóbico de la enzima, y el grupo carboxilo del D-Glu forma interacciones iónicas con un posible aminoácido con carga positiva de la fosfatasa. También se ha demostrado que el residuo Mhda es capaz de unirse covalentemente a la Cys²⁷³ de la subunidad catalítica de la PP-1 [21].

Se consideran endotoxinas ya que se encuentran localizadas, principalmente, en el interior celular: asociadas con los tilacoides y en la región del nucleoplasma [22]; [23]. Tan sólo el 10 % de la cantidad total de microcistina se considera que puede exportarse al exterior celular.

1.1.1.2. Genes implicados en la toxicidad de *Microcystis*

1.1.1.2.1. El operon *mcy*

La presencia de péptido sintetetas en cepas tóxicas y no tóxicas de la especie *Microcystis aeruginosa*, descritas por Dittmann *et al.*, (1996) y Meissner *et al.*, (1996) llevó a la identificación de un fragmento de 1982 pb, codificante de la péptido sintetasa *mapep1*, que se encontraba presente sólo en cepas tóxicas de *M. aeruginosa*. Estos resultados sugerían que la presencia de ciertos genes codificantes de péptido sintetetas determinaba la capacidad de una cepa para producir o no microcistinas [24]. A partir de *mapep1* se consiguió clonar un fragmento de 4149 pb de la cepa tóxica *M. aeruginosa* PCC7806, donde se localizó una agrupación génica formada por los genes *mcyA* y *mcyB* que se denominó “microcystin synthetase” (microcistina sintetasa). Unos años más tarde, se consiguió clonar y secuenciar la agrupación génica responsable de la síntesis de microcistina, a la que se denominó operón *mcy* [25]; [26]; [27].

El operón *mcy* se ha descrito también en *Anabaena* sp 90 [28] y en *Planktothrix agardhii* [29], presentando muchas similitudes en las cepas tóxicas de los diferentes géneros estudiados. En el caso de *Microcystis* abarca una región de 55 Kb que está compuesto por 10 marcos de lectura distribuidos en dos operones putativos (*mcyA-C* y *mcyD-J*) que se transcriben bidireccionalmente. McyA-C son tres péptido sintetetas, McyD es una policétido sintasa modular, McyE y G son enzimas híbridos que contienen módulos de péptido sintasa y de policétido sintetetas (Figura 2). De las 48 reacciones catalíticas implicadas en la síntesis de microcistina, 45 son catalizadas por los seis complejos multienzimáticos PKS/NRPS McyABCDEG [30]. McyJ, -F y -I son enzimas implicadas en la modificación de cadenas laterales (O-metilación, epimerización y deshidratación [31]; [32] respectivamente) y McyH en el transporte de la toxina, puesto que es un transportador ABC, probablemente implicado en la externalización de aproximadamente el 10% de la microcistina.

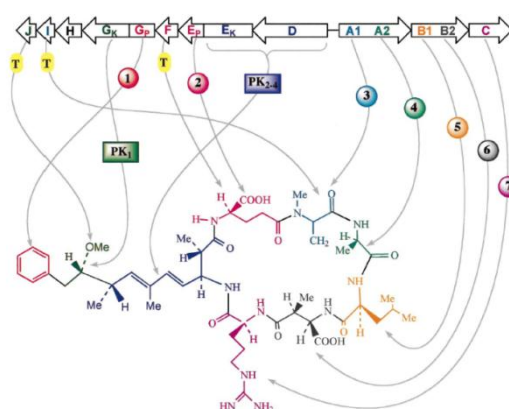


Figura 2. Estructura de operon *mcy*. Se puede ver la implicación de cada gen en la síntesis de la toxina.

1.1.1.3. NtcA, regulador global del metabolismo del nitrógeno

Las cianobacterias utilizan como fuente preferencial de nitrógeno el amonio, que atraviesa la membrana celular por difusión pasiva [33]. Una vez en el interior celular, el amonio es incorporado en compuestos orgánico como 2-oxoglutarato, mediante la ruta glutamina/glutamato sintasa [34]. Si no hay amonio disponible, las células son capaces de transportar nitritos y nitratos (con gasto de ATP), que convierten en amonio las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa. La proteína NtcA es considerada un regulador global del metabolismo del nitrógeno que activa promotores de genes relacionados con la adquisición de este nutriente, en ausencia de amonio [35]. Kuniyoshi *et al.* (2012) describieron que NtcA de *M. aeruginosa* PCC 7806 reconoce y une promotores del operon *mcy*, y que su afinidad responde a los niveles de 2-oxoglutarato, sensando el balance entre el metabolismo del nitrógeno y el del carbono. Los resultados sugieren que, en este caso, NtcA podría actuar como represor.

1.1.1.4. FUR (ferric uptake regulator)

La proteína Fur (ferric uptake regulator) se describió originalmente en *E.coli* como un represor transcripcional que controla la expresión de genes implicados en la biosíntesis de sideróforos y transportadores de hierro, mediante su unión al DNA. En 2006, Martin Luna y colaboradores [32] identificaron un miembro de la familia Fur en *M. aeruginosa*, cuya proteína reconocía y se unía a las regiones promotoras del operon *mcy* [36]; [37]; [38], sugiriendo un control transcripcional por este regulador global transcripcional. Fur es regulador global y los miembros de la familia Fur responden a la disponibilidad de hierro [39], al estrés oxidativo [40], o a la homeostasis de otros metales como el zinc [41], manganeso [42] o níquel [43].

El modelo vigente es el de un represor clásico de la transcripción. Fur se une como dímero a su región específica de DNA (denominada “iron-box”) en presencia de hierro, impidiendo el acceso de la RNA polimerasa a las zonas de inicio de la transcripción. Cuando el hierro es escaso, Fur se libera de los promotores y permite su transcripción. Homólogos de Fur se han identificado en *E .coli* y en muchas otras bacterias Gram-negativas [44]. Estudios realizados en *Anabaena* PCC 7120 muestran que podría existir una interregulación entre los distintos homólogos de la familia Fur, probablemente mediante la formación de heterodímeros. Ensayos de unión al DNA indican que FurA y FurB interaccionan con los promotores de los genes *furA*, *furB* y *furC*, mientras que FurC es capaz de modificar la afinidad de unión de FurA y FurB [45].

1.1.2. La calidad del agua

Actualmente, las cianobacterias se encuentran, prácticamente, en todos los ecosistemas de la Tierra, desde fuentes termales, hasta los hielos del Ártico [46]. Todas ellas son capaces de vivir en condiciones fotoautotróficas, y sólo algunas, en condiciones heterotróficas.

Algunas de estas cianobacterias son productoras de microcistina. Esta toxina puede alcanzar niveles elevados y provocar problemas en los seres vivos. Hay dos vías de contaminación: a través de la ingestión del agua contaminada con microcistina o por el uso de agua recreacional. Las cianobacterias han sido responsable de mortandades espectaculares de animales, incluyendo: peces, ranas, ratones y ratas, perros, ovejas y vacas [47]; [48], o incluso, rinocerontes blancos [49]; aunque, afectan especialmente a aves acuáticas [50]; [51]. En general, las muertes ocurren cuando los animales beben las aguas contaminadas, ya que, en ocasiones, las cianobacterias alcanzan niveles espectaculares. La mayoría de las poblaciones en países industrializados dependen de suministros públicos para el consumo de agua potable, y por lo tanto, uno de los mayores riesgos de contaminación para los seres humanos es a través del consumo de agua potable. En algunos países con incidencias tóxicas frecuentes (Argentina, Finlandia, Israel, entre otros) el control de las aguas contaminadas con toxinas o células de cianobacterias no es obligatorio, detectándose incluso después del tratamiento valores de

hasta 9000 cel/mL [52]. Además, hay que destacar que más de mil millones de personas no tienen el privilegio de poder acceder a aguas potables tratadas. De hecho hubo casos de gastroenteritis en Brasil, debido a que, tras la ebullición de las aguas, las células se lisaron y expulsaron las toxinas [53]. Sin embargo, también han ocurrido incidentes en países en los que existe un mayor control. En Suecia, la red de agua potable fue erróneamente mezclada con aguas de un río sin tratar [54], coincidiendo con una alta densidad de *Planktothrix agardhii*, cuyos niveles contenían aproximadamente 1 µg MC-LR/l. En los días posteriores, las 121 personas que consumieron agua contaminada desarrollaron síntomas de diarrea, dolor de cabeza, vómitos, fiebre y dolores abdominales y musculares. De forma similar al caso de Brasil, el problema de nuevo procedía de la ebullición del agua, y posterior liberación de la toxina ya que el 100% de los enfermos habían bebido té en la refinería, mientras que los que agua sin calentar no fueron afectados.

Otro riesgo de intoxicación a través de agua contaminada es mediante la diálisis. Son conocidos los casos de Portugal [55], EEUU [56] y Brasil, concretamente, el centro de diálisis de Caruaru [57]; [58], donde se demostró la presencia de MC-LR combinada con CYN en el material de relleno de las columnas de filtración de agua empleadas para la hemodiálisis [59]. Provocó la muerte de casi 200 personas, y otras muchas quedaron con daños hepáticos severos

Diversos estudios relacionan la aparición de nódulos preneoplásicos en el hígado de ratones y ratas con la exposición a microcistina [60]; [13]. Varios estudios epidemiológicos en China muestran correlación entre la ingesta de agua contaminada con “blooms” tóxicos de *Microcystis* a dosis subletales y los casos de cáncer hepático [61]; [7]; [62]; [63].

En el ser humano el efecto de la microcistina va desde cuadros alérgicos hasta cáncer hepático si la exposición es continuada. Debido al claro impacto sobre la salud, la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece en 1998, 1µg/l de microcistina-LR como valor máximo aceptable en aguas de abastecimiento público para el consumo diario. En 2003, esta recomendación fue incorporada a la legislación Española a través del Real Decreto 140/2003 para aguas de consumo; y el RD 1341/2007 en aguas de baño.

Las cianobacterias crecen en el verano avanzado, cuando hay nutrientes (especialmente fósforo), y la turbidez y la temperatura son elevadas. El problema principal asociado a la proliferación de cianobacterias es su potencial toxicidad. Se ha observado que la toxicidad en un mismo punto puede variar dependiendo del día o incluso la hora de muestreo. La población de cianobacterias en los blooms no es homogénea, y parece que los cambios en la toxicidad podría deberse a la competencia entre las cepas tóxicas y no tóxicas [64]; [65].

1.1.3. Panorama actual en España

La reciente eutrofización de nuestros acuíferos debida al modelo de grandes urbanizaciones y grandes áreas de agricultura intensiva está íntimamente asociada con la proliferación incontrolada de fitoplancton, o bloom, que pasan a dominar la parcela de fitoplancton de un cuerpo de agua. 20000 células por mililitro (10µg por litro de clorofila a) es la concentración considerada como problemática. En 1999, se describió que en Europa, Asia y América más de 40% de los lagos están eutrofizados. De acuerdo con el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), se estima que 2.200 millones de personas carecen de agua potable y que en 2025, 30% de la población no tendrá agua en cantidad y calidad suficientes para el consumo humano.

En España hay más de 1000 embalses. El fitoplancton de estos embalses y su evolución se ha estudiado desde los años 70 hasta la actualidad [66]. Las cianobacterias se citan como un importante grupo dentro del fitoplancton desde los primeros estudios [67]; [68], y se observa un incremento de las mismas en estudios posteriores [69]; [70]. Estos trabajos han mostrado que en la mitad de los embalses las cianobacterias potencialmente tóxicas son abundantes o dominantes [71]; [72]. Puede

citarse, por ejemplo, el Parque Nacional de Doñana que presenta periódicos y recurrentes episodios de mortandad en masa de fauna salvaje desde 1973 [70]; [73]. La cianobacteria tóxica *Microcystis aeruginosa* es el principal problema del fitoplancton tóxico en el Parque, apareciendo en todo tipo de aguas (lucios, charcas, canales...). Al menos tres mortandades en masa producidas en los años 2001, 2004 y 2005 se debieron a una intoxicación alimentaria por microcistina producida por esta especie; *M. aeruginosa* es la especie de cianobacteria que con mayor frecuencia ha causado problemas tanto a la vida salvaje como en embalses de abastecimiento. Estas cianobacterias existen en Doñana durante todo el año y cuando las condiciones ambientales son favorables proliferan dando mortíferas natas verde-azuladas, este hecho unido a la creciente eutrofización del agua, indican que estas mortandades van a producirse de forma natural y recurrente.

También el río Guadiana ha presentado, de forma recurrente, blooms de cianobacterias dominados, generalmente, por cepas potencialmente tóxicas [74]. En los últimos años es frecuente encontrar noticias en prensa dando cuenta de blooms tóxicos en diversas cuencas hidrográficas (Galicia, Gerona...).

1.1.4. Problemática de los contaminantes emergentes

Las numerosas actividades humanas desarrolladas en las cuencas fluviales desde la Revolución Industrial, además de reducir la cantidad del caudal circulante de nuestros ríos, provocan la llegada de numerosos contaminantes: aporte de nutrientes que provienen de aguas residuales no tratadas, fertilizantes inorgánicos industriales o extractivos, abonos orgánicos y desechos industriales [75]. La disminución de los caudales circulantes y los efectos perniciosos de los contaminantes se ven además agravadas por el cambio climático, que altera el ciclo de las sequías y las crecidas. Esta combinación de factores físicos (temperatura, radiación ultravioleta, sequía, velocidad del agua) y químicos (pesticidas, metales pesados, residuos farmacéuticos) provocan severas alteraciones de la ecología de los ríos. Estos cambios afectan especialmente a los principales responsables de la calidad del agua de ríos y embalses: fitoplancton, biofilms y bacterias. Estos organismos se encargan de la auto-depuración del agua: degradación de agentes contaminantes y reciclado de nutrientes. Por lo tanto, cualquier impacto sobre estas comunidades biológicas, también va a suponer un incremento de costes de depuración del agua para consumo humano.

Hasta el momento no se conoce con detalle cómo pueden influir las variables ambientales en la producción de toxinas. Sin embargo, la presión humana sobre los residuos hídricos combinada con el cambio climático, está provocando ya un incremento en la aparición de episodios tóxicos. Durante décadas, la comunidad científica ha centrado sus esfuerzos en el estudio de los contaminantes químicos, cuya presencia en el medio ambiente ha estado regulada en las distintas legislaciones, contaminantes en su mayoría apolares, tóxicos, persistentes y bioacumulables, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los policlorobifenilos o las dioxinas. El desarrollo de nuevos y más sensibles métodos de análisis ha permitido alertar de la presencia de otros contaminantes, potencialmente peligrosos, denominados globalmente como emergentes. Los contaminantes emergentes son compuestos de distinto origen y naturaleza química cuya presencia en el medio ambiente, o las posibles consecuencias de la misma, han pasado en gran parte inadvertidas, razón por la cual no se dispone de reglamentación de métodos de análisis y no han sido regulados. Son compuestos de los que se sabe relativamente poco o nada acerca de su impacto en los distintos compartimentos ambientales y en el hombre y que, por tanto, precisan investigación. Su estudio se encuentra entre las líneas de investigación prioritarias de los principales departamentos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental, como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA) o la Comisión Europea. La lista de contaminantes emergentes incluye una amplia variedad de productos de uso diario con aplicaciones tanto industriales como domésticas. Algunos de ellos, a raíz de las intensas investigaciones llevadas a cabo en los últimos años, han sido incluidos en la lista de sustancias prioritarias en el agua, como los retardantes de llama. Otros, como los pesticidas, ya estaban sujetos a legislación, pero el descubrimiento de productos de

degradación tóxicos, ha renovado el interés por los mismos. En el caso de los fármacos, la toma de conciencia del riesgo es relativamente reciente, y no se tienen aún datos suficientes para una valoración apropiada de su impacto. Muchos de estos contaminantes son disruptores endocrinos, lo que implica que una exposición a los mismos puede dar lugar a alteraciones en el crecimiento, desarrollo, reproducción y comportamiento de los organismos vivos [76].

1.1.4.1. Lindano

La práctica de la agricultura ha ido siempre unida a la utilización de productos químicos destinados a favorecer el crecimiento y producción de las distintas especies vegetales, así como su protección frente a plagas y otros agentes que puedan llegar a arruinar las cosechas.

A finales de los 50, después de la segunda Guerra Mundial, se comienzan a utilizar masivamente los productos organoclorados como pesticidas, no sólo en la agricultura, sino también como agentes de control de parásitos del hombre y de animales. La persistencia en el medio ambiente es beneficiosa para el agricultor, pero resulta perjudicial para el medio ambiente ya que aumenta la exposición de los organismos a esas sustancias tóxicas. Algunos compuestos organoclorados no son biodegradables, por lo que pueden reciclarse a lo largo de la cadena alimenticia, produciéndose un aumento de la concentración química al final de ésta.

Uno de los compuestos más utilizados fue el lindano. Químicamente es uno de los cinco isómeros del hexaclorociclohexano (HCH), concretamente el isómero gamma. Estos isómeros se diferencian en cómo se encuentran unidos los átomos de cloro a los carbonos de la molécula de ciclohexano [77]. Teóricamente, son posibles ocho isómeros:

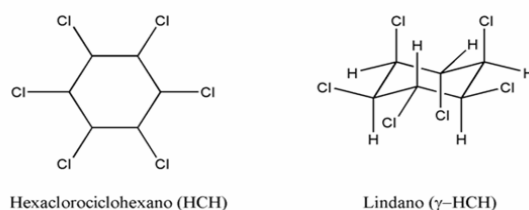


Figura 3. Fórmula química del isómero γ y del hexaclorociclohexano.

Sin embargo, las consideraciones de tensión posibilitan únicamente cinco de ellos, que se denominan: α, β, δ, γ y ε. El lindano se sintetizó por primera vez en 1825 mediante la cloración del benceno en presencia de luz ultravioleta [78]; [79]. Sus propiedades insecticidas se descubrieron en Europa en 1941, sin embargo, en 1944 se encontró que sólo el isómero γ es responsable de estas propiedades [80].

El lindano ha sido utilizado en agricultura, veterinaria, e incluso en el ámbito de la salud humana porque es un insecticida de amplio espectro (sirve igualmente para matar a insectos fitófagos como para los parásitos de los animales). Hoy día su toxicidad ha sido comprobada, y está siendo prohibido en varios países. La primera evidencia de que el lindano podía causar toxicidad y muerte en humanos se remonta a 1953 [81]. Pero las consecuencias de la fabricación de lindano no han desaparecido.

El peligro del lindano procede de que, como todos los organoclorados, además de ser tóxico tiene la capacidad de ser almacenado en los seres vivos (bioacumulación). Es dañino para la salud humana y para el ambiente. El HCH se asimila ingiriéndolo, respirándolo o por contacto y sus efectos tóxicos dependen de la cantidad de isómeros que lo formen y principalmente de la cantidad de isómero gamma que contenga. Si se toma en grandes cantidades, el HCH provoca dolores de cabeza, cansancio, debilidad, malestar, insomnio, diarreas, vómito y fiebre, e incluso la muerte, si se tomara en

muy grandes cantidades. A pequeñas dosis, pero en exposiciones largas (toxicidad crónica) causa problemas hepáticos, renales, hormonales, ginecológicos, sanguíneos (anemias). Se ha visto que causa alteraciones endocrinas y daños en el sistema nervioso central, donde interfiere con la función del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) por interacción con su receptor [82]; [83]; [84]. Por otro lado, se ha encontrado que en alguna especie animal resulta cancerígeno, y se podría pensar que también lo puede ser para el hombre, aunque esto no está demostrado todavía. La OMS recomienda tratar el HCH y sus isómeros como si fuesen cancerígenos [85]; [86].

Desde el punto de vista ambiental, al ser un compuesto apolar, el HCH es lipofílico y puede infiltrarse en la materia blanca, rica en lípidos, del cerebro [87]. Además se biodegrada lentamente y es muy estable en condiciones ambientales normales. Por lo tanto, el HCH se almacena fácilmente en los seres vivos y en el ambiente. El lindano sólido puede degradarse bajo condiciones aeróbicas; la vida media va desde los 88-1200 días. A pesar de todo esto, durante muchos años no se han tomado en serio los peligros que podía conllevar el uso del HCH y en muchos lugares, entre ellos el País Vasco y Aragón, ha sido vertido al medio ambiente sin ningún tipo de control. Hoy día nos damos cuenta de la necesidad de solucionar los problemas originados por estos vertidos, y de la dificultad de hacerlo ya que, todavía no existe un proceso viable para destruir con seguridad el lindano mezclado con tierra.

Durante muchos años, dos empresas ubicadas en Euskadi han estado fabricando lindano: Bilbao Chemicals (Barakaldo 1947-1987) y Nexana (Erandio 1952-1982). En estos años han estado vertiendo los residuos de HCH sin ningún tipo de tratamiento ni medidas de seguridad. Hasta el año 1953 en el caso de Bilbao Chemicals y el 1974 en el caso de Nexana, todo el HCH (mezcla de varios isómeros) producido se vendía como insecticida. Sin embargo, a partir de estos años se comenzó a separar el isómero gamma (más efectivo) y se empezó a comercializar individualmente. La relación entre producto comercial y residuos es de 1:9, y en consecuencia, desde que se comenzó a separar el isómero gamma se empezó a almacenar numerosos residuos en pabellones, y comenzaron a verter dichos residuos sin ningún tipo de control. Esta es la causa de que se hayan vertido y mezclado con tierras unas 80.000 Tm, permaneciendo en estado puro en la fábrica de Barakaldo 4.500 Tm más al cierre de la empresa Bilbao Chemicals. Hoy día no se produce lindano en el País Vasco. Sin embargo, el problema no se ha solucionado con el cierre de Bilbao Chemicals y Nexana, ya que queda por determinar qué se va a hacer con los residuos esparcidos alrededor de las zonas de producción y con el HCH puro de Barakaldo.

En la cuenca del río Gállego se construyeron aprovechamientos hidroeléctricos a comienzos del siglo XX, lo cual favoreció la instalación de numerosas industrias en el entorno de Sabiñánigo, muchas de las cuales se dedicaron a la fabricación de productos químicos (ácido sulfúrico, aluminio electrolítico, cloro, ácido clorhídrico, HCH, fósforos, etc). INQUINOSA, una empresa productora de lindano se estableció en Sabiñánigo en 1975. Los residuos de HCH (isómeros restantes, 83%) producidos en la fabricación del lindano (17%) fueron depositados durante años en varios puntos, entre ellos los vertederos de Sardas y Bailín. En 1987 comenzaron las primeras denuncias por las irregularidades en los vertidos y la contaminación del río Gállego, terminando con su cierre en 1989. En el vertedero de Sardas, en el cual se depositaron sin ningún tipo de medida de control (impermeabilización, captación de lixiviados, depuración de aguas, etc) todos los residuos industriales generados en la zona, junto con residuos urbanos y escombros de construcción. Este vertedero permaneció en explotación hasta 1987, aun cuando a partir de 1984 INQUINOSA comenzó a verter en el nuevo vertedero municipal de Bailín. Así pues, durante más de 30 años los residuos industriales de las empresas radicadas en Sabiñánigo se fueron depositando en estos dos vertederos. Ambos vertederos, Sardas y Bailín, están muy próximos al río Gállego, y en sus aguas se ha detectado puntualmente la presencia de isómeros de HCH. Las concentraciones encontradas motivaron que en diciembre de 1988, la Diputación General de Aragón (DGA) prohibiese el depósito de residuos tóxicos y peligrosos, procedentes de la fabricación de Lindano en los vertederos de la zona, y que la Confederación Hidrográfica del Ebro (CHE), prohibiese el vertido de aguas residuales procedentes de la

fabricación de Lindano. Durante el año 2005 se detectó residuo libre de HCH y otros organoclorados en los piezómetros de control situados aguas abajo del vertedero de Bailín y, en febrero de 2009, se comenzó a detectar residuo libre de HCH en la base del talud de la carretera que pasa junto al vertedero de Sardas.



Figura 4. Noticias relacionadas con la empresa INQUINOSA publicadas en El Heraldo de Aragón en los meses de mayo de 2012.

En particular, el problema de los suelos contaminados con HCH no parece tener una solución clara hoy día. Se ha decidido almacenar las tierras contaminadas en una Celda de Seguridad mientras se encuentre una tecnología adecuada. Esta medida servirá para eliminar los daños ambientales y de salud que podrían provocar estas tierras en el período de búsqueda del sistema a utilizar.

1.1.4.2. Fármacos en las aguas

Los contaminantes emergentes que, probablemente, están suscitando una mayor preocupación y estudio en los últimos años son los fármacos. En los países de la Unión Europea se consumen toneladas por año, y muchos de ellos se emplean en cantidades similares a los pesticidas [88]. Una particularidad de estos compuestos es que debido a su elevada producción y consumo, y a la continua introducción de los mismos en el medio ambiente, no necesitan ser persistentes para ocasionar sus efectos negativos [76].

Las primeras evidencias de la presencia de fármacos en el medio acuático se produjeron en los años 70 al identificar ácido clofíbrico (metabolito activo de varios reguladores de lípidos en sangre) en aguas residuales de EEUU. Sin embargo, ha sido en la década de los 90 cuando el tema ha surgido con fuerza. En España, la publicación en la prensa de los resultados obtenidos por el equipo de investigación del Dr. Barceló (El Periódico, 26 Octubre 2005; El país, 17 Enero 2006; El Global, 30 Enero 2006) despertó un gran interés científico y social.

Entre los fármacos más utilizados se encuentran los analgésicos/antiinflamatorios como el ibuprofeno y el diclofenac, los antiepilépticos como la carbamacepina y los β -bloqueantes como el atenolol. Según las propiedades físico-químicas de los fármacos, sus metabolitos y productos de degradación, así como las características de los suelos, estas sustancias pueden llegar a alcanzar las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos o quedar retenidas en el suelo y acumularse pudiendo afectar al ecosistema y a los humanos, a través de la cadena trófica [89]. Estos compuestos se han encontrado en concentraciones de ng/ml o μ g/ml en aguas superficiales y subterráneas, como consecuencia de una eliminación incompleta en las plantas de depuración de aguas o debido a la escasa atenuación que experimentan algunos compuestos durante la filtración a través de suelos. En suelos y sedimentos, estos compuestos pueden persistir durante años, llegando a alcanzar concentraciones de hasta g/Kg [89]; [90].

En muchos casos, las consecuencias de su presencia en el medio ambiente no están claras, pero en otros, el riesgo es evidente y alarmante [91]. El equipo de investigación del Dr. Barceló ha

detectado en múltiples ocasiones en España la presencia de propranolol, un β -bloqueante, que se ha visto tiene efectos sobre el zooplancton y los organismos bentónicos [89]; [92]. Lo más probable es que en un futuro próximo la Unión Europea fije límites máximos que regulen la presencia de estos compuestos en el agua potable.

El río Ebro ha sido objeto de estudio en los últimos años en el marco del proyecto europeo AQUATERRA (Integrated modeling of the river-sediment-soil-groundwater system). Entre los contaminantes más relevantes en esta cuenca se encuentran los fármacos, que no son completamente eliminados por las EDARs, y los plaguicidas procedentes de las actividades agrícolas. Estimaciones realizadas dentro del marco del proyecto AQUATERRA indican que se vierten al río, tras su paso por las Estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs), unas tres toneladas de fármacos al año, entre los que destacan: el acetaminofén (paracetamol), el ibuprofeno (antiinflamatorio) o el atenolol (β -bloqueante). Si además de los fármacos, tenemos en cuenta los diferentes plaguicidas, la carga anual del río Ebro puede llegar fácilmente a las 7-8 toneladas de contaminantes anuales [93].

OBJETIVO

Estudiar el efecto del lindano sobre la síntesis de la cianotoxina microcistina en *Microcystis aeruginosa* PCC 7806.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- 1) Estudiar el crecimiento de *M. aeruginosa* PCC 7806 en presencia de lindano y describir su tolerancia.
- 2) Estudiar los cambios inducidos por el lindano en los niveles de RNA mensajero de genes marcadores del operon responsable de la síntesis de microcistina: *mcy*.
- 3) Estudiar los cambios inducidos por el lindano en los niveles de RNA mensajero de genes reguladores del operon *mcy*.
- 4) Valorar la cantidad de microcistina producida en cada caso.

Además, se ha llevado a cabo la cuantificación de la microcistina de cultivos en presencia de algunos contaminantes emergentes como: paracetamol, ibuprofeno, atenolol, voltarén y benceno.

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Estirpe utilizada.

Para llevar a cabo este trabajo, se ha empleado la cepa de cianobacteria *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, organismo unicelular con alta capacidad productora de microcistina. Esta cepa tóxica procede de la colección de cultivos del Instituto Pasteur de París (www.pasteur.fr).

2.2. Condiciones de cultivo.

Para el cultivo en medio líquido, se prepararon tres soluciones siguiendo las indicaciones del Instituto Pasteur (Medio 553). En la tabla 1, se detallan el modo de almacenamiento adecuado y la fecha de caducidad de las mismas.

Solución 1		Solución 3	
Componentes:		Componentes:	
Citrato férrico amónico	30 mg	H ₃ BO ₃	2,86 g
Ac Cítrico monohidratado	30 mg	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81 g
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	222 mg
Volumen final:	25 ml en H ₂ O	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	390 mg
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	79 mg
Plazo de caducidad	10 días a t.a. en oscuridad	Co(NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O	49 mg
		Volumen final:	1 L en H ₂ O
		Plazo de caducidad:	6 meses a 4°C

Solución 2	
Componentes:	
Mg·2H ₂ O tritriplex	100 mg
Volumen final:	500 ml en H ₂ O
Plazo de caducidad	3 meses a 4°C

Tabla 1. Composición de las tres soluciones previas para la preparación del medio de cultivo.

2) Para cada litro de medio de cultivo se utilizaron los siguientes reactivos y disoluciones: (Tabla

MEDIO 538	
COMPONENTE	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	36 mg
Na ₂ CO ₃	40 mg
NaNO ₃	150 mg
Solución 2	5 ml
Solución 3	1 ml
Volumen final	1 L

Tabla 2. Composición del medio de cultivo.

Una vez reconstruido el medio, se esteriliza la disolución en el autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1 kg/cm² de presión. Tras ser esterilizado, se suplementa con 10 ml de NaHCO₃ (1 M), 5 ml de la solución 1 y 0.23 M de K₂HPO₄ a través de filtros de 0,20 µm para garantizar la esterilidad.

Los cultivos se iniciaron en erlenmeyers de 250 ml con agitación constante a 150 rpm. Una vez en fase exponencial, para continuar el cultivo a mayor escala se utilizaron frascos de Roux de 1L de capacidad burbujeando con aire estéril, lo que permite una correcta aireación y agitación del cultivo (Figura 5).

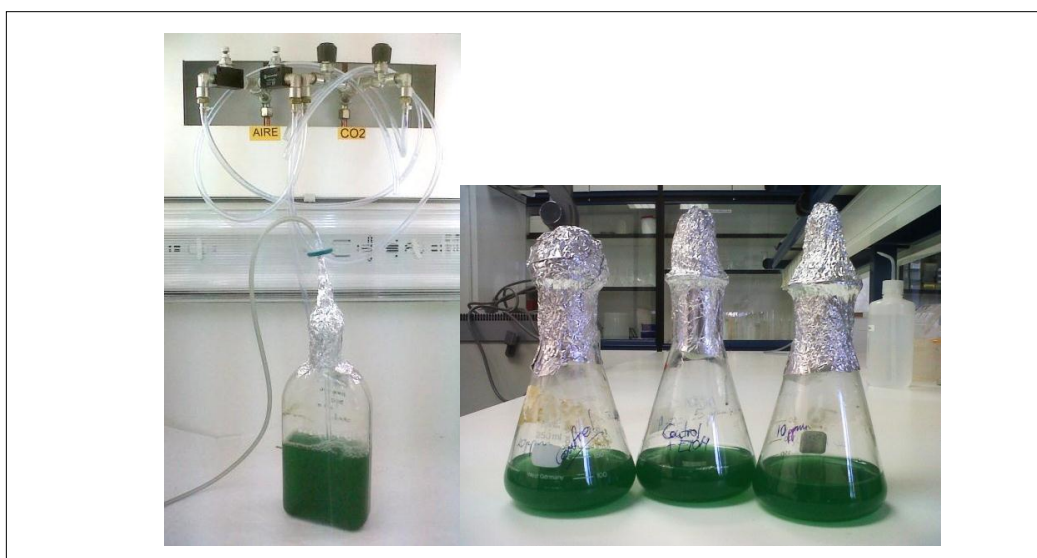


Figura 5. Cultivo en frascos de Roux y erlenmeyers de *M. aeruginosa* en medio 553.

En todos los casos, la temperatura se mantuvo entre 25-30°C y la iluminación fue lateral con luz blanca (48 µmoles de fotones/m²·s). La intensidad de luz se midió con el luxómetro (Quantum Sensor).

Para los cultivos en medio sólido, el medio se suplementa con 1% (p/v) de agarosa. Una vez solidificado, se siembra los cultivos y se incuban a 25-30°C con luz blanca de baja intensidad (aproximadamente, 20 µE/m²·s).

2.2.1. Cultivo de *M. aeruginosa* PCC 7806 en presencia de lindano.

Los experimentos con el pesticida se llevaron a cabo con células crecidas inicialmente en frascos de Roux en medio 553 con agitación e iluminación continuas. Alícuotas de este cultivo se diluyeron con el mismo medio hasta alcanzar una densidad óptica (700 nm) en torno a 0.6-0,7 en erlenmeyers de 250 ml.

Se realizaron dos experimentos. En el primero de ellos, el lindano se disolvió en etanol, por lo que se hicieron tres alícuotas: una condición control realizada con el medio 553, una condición de análisis del solvente realizada con medio 553 y etanol y un tratamiento con lindano de la casa comercial SIGMA de pureza 99%, realizado con medio 553 y la disolución de lindano en etanol. En el segundo, tras la búsqueda bibliográfica de la solubilidad del lindano en agua, el lindano se disolvió en agua milli-Q, por lo que sólo se prepararon dos alícuotas: una condición control con agua milli-Q y un tratamiento con lindano en agua milli-Q. Todas la preparaciones del proceso se llevaron a cabo en campana de flujo laminar y material estéril.

2.2.2. Cultivo de *M. aeruginosa* PCC 7806 en presencia de otros contaminantes emergentes: paracetamol, ibuprofeno, atenolol, voltarén y benceno.

Los experimentos con los fármacos y el benceno se iniciaron del modo descrito en el apartado anterior (2.3.). A los erlenmeyers de 250 ml con una densidad óptica a 700 nm de 0.6-0.7 se les adicionó las distintas concentraciones de los compuestos. Todos los compuestos se disolvieron en agua milli-Q.

- Para el benceno, se estudiaron dos concentraciones distintas: 50 µg/l y 100 µg/l.
- En el caso del paracetamol (NORMON) se estudiaron concentraciones crecientes de 0-166 µg/l. Para el resto de los compuestos la concentración utilizada fue diez veces superior a la descrita en la literatura como presente en ríos españoles: para el ibuprofeno (Abbott) fue de 200 µg/l y para el atenolol (NORMON) y el voltarén (NORMON), 20 µg/l.

2.3. Contaje de células.

El contaje se llevó a cabo mediante una cámara de Neubauer. De esta forma, la concentración de células por mililitro se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración (células / mL)} = \frac{10000 \times \text{Suma del número de células contado por cuadrante (L)}}{\text{Número de cuadrantes contados}}$$

M. aeruginosa tiende a formar agregados que imposibilitan su contaje; se añadió KOH (1 M) al cultivo para disgregar las células antes de comenzar el recuento. La dilución necesaria para el contaje se obtuvo con el KOH, por lo que el volumen añadido del mismo varió según la muestra.

2.4. Determinación del contenido de clorofila *a*.

Con el fin de tener una idea más exacta de la tasa de crecimiento de *M. aeruginosa* PCC 7806, se determinó el contenido de clorofila *a* de los cultivos celulares espectrofotométricamente, según el procedimiento descrito por Mackinney (1941). Se añadió 1ml de metanol a 0.2 ml del cultivo a analizar, agitando vigorosamente durante 1 minuto. La suspensión se centrifugó a 13000 g durante 5 minutos. El sobrenadante contiene la clorofila *a*; la concentración de ésta se determinaba en función de su absorción a 665 nm, utilizándose como coeficiente de extinción de la clorofila *a* el valor de 74,46 (mg/ml)⁻¹cm⁻¹. Todo el proceso se realizó en oscuridad, ya que la clorofila *a* puede degradarse en presencia de luz.

2.5. Determinación de carotenoides

El contenido en carotenoides se determinó siguiendo el método de Davies (1976) [94]. Se centrifugaron 5 ml de cultivo celular a 5000 g durante 7 minutos. El precipitado se lavó con agua destilada dos veces, centrifugando seguidamente en las mismas condiciones. Las células se resuspendieron en 1 ml de agua destilada y se sometieron al siguiente tratamiento de ultrasonidos: cuatro periodos de 45 s con intervalos de 30 s y en baño de hielo, para evitar el calentamiento de la muestra. La potencia fue de 80 W y la frecuencia de oscilación de 20 kHz. Se añadieron 10 ml de acetona al 80% y se centrifugó la muestra a 2500g durante 5 minutos. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 480, 465, y 663 nm. La absorbancia neta de los carotenoides viene dada por la siguiente ecuación, siendo $\epsilon=250 \text{ ml/mg}\cdot\text{cm}^{-1}$.

$$A_{480} = A_{480} + 0.114 \cdot A_{663} - 0.638 \cdot A_{465}$$

2.6. Determinación de ficobiliproteínas

El contenido en ficobiliproteínas de las muestras se cuantificó mediante el método de Glazer (1976) [95]. Se centrifugaron 5 ml del cultivo a 5000 g durante 5 minutos. El precipitado se lavó con

agua destilada dos veces, centrifugando en las mismas condiciones seguidamente. El pellet se redisolvió en 1 ml de agua destilada y se rompe por ultrasonidos durante cuatro periodos de 45 s con intervalos de parada de 30 s, en las mismas condiciones que se utilizaron para los carotenoides. El sonificado se centrifugó a 2500g durante 5 minutos. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 620 nm frente a agua. El coeficiente de extinción utilizado fue $\epsilon=7.41 \text{ ml/mg}\cdot\text{cm}^{-1}$.

2.7. Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno

El método utilizado está basado en el estudio de [96]; [97]; [98]. Consiste en la oxidación por parte del agua oxigenada del Fe^{2+} del sulfato de amonio ferroso (sal de Mohr) a Fe^{3+} . El Fe^{3+} forma un complejo de color rojo con los iones SCN^- del tiocianato potásico.

Se recolectaron 50 ml de cultivo en un tubo falcon y se concentraron hasta un volumen aproximado de 1 ml. Este mililitro se centrifugó en un eppendorf a 14000g durante 5 minutos a 4°C obteniéndose un pellet de células de entre 50-100 mg de peso húmedo. Se añadieron 720 μl de agua milliQ y 80 μl de TCA al 50%, con el fin de obtener una concentración final de TCA del 5 %. Se homogeneizó la disolución y se centrifugó a 12000 g durante 5 minutos a 4°C para que el pellet de proteínas se depositase.

Se midió la absorbancia a 480 nm de la siguiente mezcla de reactivos (añadidos en orden):

- 800 μl de extracto crudo
- 160 μl de TCA al 50%
- 160 μl de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 10 mM
- 80 μl de KSCN 2.5 M

El valor obtenido se interpoló en la recta de calibrado expresada en la tabla 3:

$\text{H}_2\text{O MQ}(\mu\text{l})$	H_2O_2 0.194M(μl)	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 10mM(μl)	KSCN 2.5M(μl)	TCA 50%(μl)	$\text{H}_2\text{O}_2(\mu\text{mol})$
800	0	160	80	160	0
794.8	5.2	160	80	160	1.0088
789.8	10.2	160	80	160	1.9788
784.4	15.6	160	80	160	3.0264
779.4	20.6	160	80	160	3.9964
774.2	25.8	160	80	160	5.0052
764	36	160	80	160	6.984

Tabla 3. Recta de calibrado.

2.8. Extracción de microcistina-LR de cultivos de *M. aeruginosa* PCC 7806

Se llevó a cabo la extracción de microcistina de los cultivos control y con lindano a distintos tiempos. Para ello, se centrifugaron 5 ml de cultivo en un falcon a 4000 g durante 10 minutos. Se guardó una alícuota del sobrenadante a -20°C, representativa del contenido en microcistina en el exterior celular; se retiró el resto del sobrenadante y se congelaron las muestras a -80°C hasta que todo el ensayo ha concluido. Se liofilizó el pellet para ayudar a la rotura de la pared celular.

La extracción de microcistina se realizó utilizando el siguiente solvente:

- 80% metanol
- 0.1% TFA
- 0.1% Tween
- 19.8% agua destilada

Se añadió 1 ml del disolvente de extracción y se agitó vigorosamente. Se centrifugaron las muestras a 4000 g durante 10 minutos retirando el sobrenadante, que contiene la microcistina. Se repitió el proceso durante cuatro extracciones. Finalmente se hizo un “pool” con el sobrenadante resultado de las cuatro extracciones. Todo el proceso fue realizado en ausencia de luz para evitar la posible degradación de la microcistina durante el mismo.

Para llevar a cabo la cuantificación de las microcistinas presentes en los extractos, se utilizó un Kit basado en la inhibición de la proteín-fosfatasa 2A (ZEU- Inmunotec).

2.8.1. Ensayo de inhibición enzimática de la proteín fosfatasa 2A

La inhibición enzimática de la proteín fosfatasa 2A es un método rápido de cuantificación. Este ensayo detecta concentraciones en un rango muy bajo de microcistina (de 0,25 a 2,5 µg/L), lo que permite medir las fracciones extracelulares de los diferentes cultivos de *M. aeruginosa* PCC 7806. Este Kit fue desarrollado por nuestro grupo de investigación en colaboración con la empresa ZEU-Inmunotec. Recientemente, este ensayo ha sido validado y comercializado lo que ha facilitado a los analistas la utilización de esta metodología que hasta hace unos años se limitaba sólo a laboratorios de investigación [99]. Este ensayo se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante (ZEU-Inmunotec). Cuantifica la microcistina basándose en su toxicidad, es decir, en el efecto inhibitorio que produce sobre la proteín-fosfatasa 2A (PP2A) [100].

- Se resuspendió un vial de la enzima PP2A en 3 mL de tampón “buffer fosfatasa” y se dejó en agitación (180 rpm) en ausencia de luz durante 1 hora.
- En cada pocillo de una placa de microtitulación, se añadieron 50 µl de los patrones o muestras. Se utilizaron patrones de microcistinas-LR en un rango de concentración de 2,5 µg/L a 0,25µg/L.
- A continuación, se añadieron 70 µl de PP2A en cada pocillo con muestra o patrón. Finalmente, se adicionó 90 µl de sustrato cromogénico (p-nitrofenilfosfato pNPP) en cada pocillo.
- La placa se incubó durante 30 min a 37°C, leyéndose, posteriormente, la absorbancia en un lector de placas a 405 nm.

Se hizo una curva de calibrado con los valores de los porcentajes de inhibición de los patrones frente a la concentración de los mismos. La concentración de microcistina-LR en las muestras se calculó por interpolación de los datos en la recta obtenida. Cada muestra se aplicó por triplicado.

2.9. Microscopio óptico

Los cultivos celulares estresados con la concentración de trabajo de lindano y otros fármacos, se visualizaron al microscopio óptico (Nikon Eclipse 50i Epi-flourescence) con el objetivo de analizar si habían sufrido alguna variación morfológica, detectable a esa resolución, con respecto al cultivo control. Las fotografías se hicieron con una cámara Nikon DXM 1200F.

2.10. Aislamiento de RNA total de *M.aeruginosa* PCC 7806

2.10.1. Precauciones

Una de las dificultades principales asociadas al trabajo con RNA, es la degradación que ocasionan las RNAsas, tanto endógenas como exógenas. Son enzimas muy estables, lo que hace especialmente importante trabajar en condiciones asépticas y tomando precauciones a distintos niveles para evitar su presencia durante el proceso de extracción:

- El investigador es una de las principales fuentes de RNAsas, por lo que es necesario utilizar guantes, que hay que renovar con frecuencia, y evitar hablar cerca de las muestras.

- Los reactivos deben ser libres de RNAsas y las disoluciones deben prepararse con una espátula lavada con NaOH 0.4 N. El agua utilizada para su preparación, y para cualquier etapa posterior de la extracción, debe ser agua milli-Q tratada con 0.1% (v/v) DEPC (dietilpírocarbonato) que reacciona con rapidez con los grupos amino inactivando de esta forma las RNAsas por modificación covalente. La botella, protegida de la luz, se mantiene durante 12h a 37°C con agitación suave. Posteriormente, el DEPC se elimina del agua por su posible reacción con los residuos de purina del RNA, mediante un tratamiento de 20 minutos a 121°C y 1 Kg/cm², que desencadena la hidrólisis del DEPC libre produciendo CO₂ y etanol, que se liberan al medio por evaporación.
- Es necesario el autoclavado del material de vidrio, aunque no asegura la inactivación de las RNAsas, ya que son termoestables. Para ello, debe lavarse con NaOH 0.4 N y enjuagarse con agua DEPC previamente. El material de plástico tiene que ser libre de RNAsas, estéril y desechable, en caso contrario, deberá lavarse también con NaOH, igual que la poyata, micropipetas o cualquier otro material.

2.10.2. Toma de muestras

Las células deben recogerse y conservarse en unas condiciones adecuadas para, posteriormente, llevar a cabo una extracción del RNA óptima. Es preferible trabajar en frío y lo más rápidamente posible, de esto depende en gran medida la representatividad de la muestra tomada, ya que la población de RNA varía con el tiempo (la maquinaria transcripcional sigue funcionando hasta que las células se congelan).

Se recogieron por centrifugación a 4000g durante 3 minutos a 4°C, 25 ml de cultivo. Se decantó el sobrenadante hasta un volumen de 1-2 ml que se trasvasó a un eppendorf libre de RNAsas. Se centrifugaron los eppendorf durante 5 minutos a 12000g y 4°C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 600 µl de Tris 50 mM (pH 8), EDTA 100 mM y 130 µl de cloroformo. Se incubaron en hielo durante 3 minutos y se centrifugaron a 13000 g durante 5 minutos a 4°C. Tras esta centrifugación se obtienen tres fases: la fase superior acuosa y la fase inferior orgánica se eliminan. La interfase se congela inmediatamente con N₂ líquido y se guarda a -80°C.

2.10.3. Extracción de RNA total de *M.aeruginosa* PCC 7806

Para la extracción del RNA se utilizó un protocolo descrito para cianobacterias del género *Anabaena*. Los rendimientos en la extracción de RNA obtenidos para *Microcystis* son bajos debido a la pared tan dura que presenta esta cianobacteria, por lo que se utilizaron cultivos con una densidad óptica de 0.6-0.7. El trabajar con densidades ópticas elevadas proporcionaba muestras finales impuras (en su mayoría con DNA y otras impurezas que inhibían su digestión), por lo que se utilizó como reactivo en la extracción TRIZOL, que proporcionaba una mayor limpieza que el fenol ácido. La extracción se llevó a cabo de la siguiente manera:

- I) Las muestras se sacan del -80°C y se les añade:
 - 300 µl de búffer de resuspensión
 - 100 µl de EDTA 250 mM, pH 8
 - 400 µl de búffer de lisis
 - 1 ml de fenol ácido a 65°C
- II) Se agitan los eppendorf vigorosamente durante 30 s y se incuban 2.5 minutos a 65°C, repitiendo el proceso dos veces.
- III) Se centrifugan durante 5 minutos a 13000 g y se traspasa la fase acuosa a un eppendorf limpio.
- IV) Se añade 1 ml de TRIZOL, se mezcla y se deja reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se añaden 200 µl de cloroformo, se agita de nuevo y se deja reposar 1 minuto.

- V) Se centrifugan las muestras durante 5 minutos a 13000 g y se traspasa la fase acuosa a un eppendorf limpio.
- VI) Se extrae con 1 volumen de cloroformo y se centrifugan durante 5 minutos a 13000 g.
- VII) Se traspasa la fase acuosa a un eppendorf limpio y se añade 1 volumen de isopropanol frío.
- VIII) Se congelan en N₂ y se centrifugan a velocidad máxima durante 30 minutos.
- IX) Se retira el sobrenadante y se lava el pellet con 500 µl de EtOH al 70%.
- X) El pellet se redisuelve en 180 µl de agua DEPC. Se añaden 20 µl de búffer de DNAsa I y 2 µl de la enzima. Se incuba la mezcla a 37°C durante 1h.
- XI) Pasado el tiempo de digestión, se elimina la enzima mediante una extracción con 1 volumen de fenol ácido:cloroformo (v/v), agitando vigorosamente.
- XII) Se centrifugan los eppendorf a 13000 g durante 5 minutos a 4°C y se traspasa la fase acuosa a un eppendorf limpio.
- XIII) Se extrae con 1 volumen de cloroformo y se centrifuga a 13000 g durante 5 minutos a 4°C.
- XIV) A la fase acuosa se le añaden 2 volúmenes de EtOH absoluto frío y se congela con N₂ líquido.
- XV) Se centrifugan las muestras a velocidad máxima durante 30 minutos a 4°C.
- XVI) Pasado este tiempo se retira el sobrenadante y se lava el pellet con 500 µl de EtOH al 70%.
- XVII) Se retira el sobrenadante y se deja secar el pellet. Finalmente, se redisuelve en 20 µl de agua DEPC y se guarda a -80°C.

2.11. Electroforesis no desnaturizante del RNA

Tras la extracción del RNA, antes de continuar con el tratamiento de las muestras, es aconsejable analizar las muestras con una electroforesis en gel de agarosa al 1% no desnaturizante visualizado con bromuro de etidio 0.5 µg/ml, para comprobar de modo cualitativo/semicuantitativo: la integridad del RNA, su concentración y la limpieza de la muestra (cantidad de DNA contaminante). La técnica es muy similar a la utilizada para la visualización de DNA pero teniendo en cuenta las precauciones necesarias en el trabajo con RNA.

- En los pocillos se carga 1 µl del RNA total mezclado con 2 µl de agua DEPC y 2 µl de tampón de carga.
- Las condiciones de la electroforesis son 90 V de voltaje en una fuente de corriente BioRad PowerPac300. Los resultados se visualizan con un equipo GelDoc 2000 (BioRad) y el programa MultiAnalist 1.1 (BioRad Laboratorios, 1997).

2.12. Determinación de la concentración de RNA

El cálculo de la concentración y pureza del RNA se lleva a cabo mediante medidas espectrofotométricas realizadas en un nanoVue (GE Healthcare). Los ácidos nucleídos tienen un máximo de absorción característico en el ultravioleta a 260 nm, por lo que midiendo su A₂₆₀ y comparándola con las referencias establecidas para una concentración conocida se puede deducir su concentración.

En este equipo se hace la medida del espectro entre 250-600 nm, registrando las absorbancias a 260 y 280 nm. Estos valores se corrigen teniendo en cuenta la absorbancia a 600 nm, que nos da idea de la turbidez de la muestra. Teniendo en cuenta que 1 unidad de A₂₆₀ (ssRNA)=40 µg/ml calcula la concentración de RNA a partir de la medida de su A₂₆₀.

El ratio A₂₆₀/A₂₈₀ nos informa de la pureza de la muestra en cuanto a la presencia de proteínas. Si esta relación se sitúa entre 1.8-2.0, la muestra tiene una alta pureza en RNA.

2.13. Control negativo de la presencia de DNA

El estudio de la expresión génica se puede abordar con diferentes técnicas como: “Northern-Blot”, ensayo de protección de la RNAsa (“RNase protection assay”/RPAs) y retrotranscripción del RNA a cDNA y posterior amplificación y cuantificación (RT-PCR).

En este trabajo se seleccionó la RT-PCR semicuantitativa para llevar a cabo el estudio de los cambios en la expresión génica a nivel transcripcional de ciertos genes de *M. aeruginosa* PCC7806. Mediante la retrotranscripción del RNA a cDNA y la aplicación posterior de la amplificación en cadena de la polimerasa, se obtiene información sobre la presencia, desde un punto de vista semicuantitativo, de un determinado transcrito en la muestra de RNA total.

Es esencial tener un control que asegure la ausencia de DNA en la muestra, ya que los geles de agarosa no tienen la resolución suficiente para asegurar que la muestra está totalmente libre de DNA. Para ello, se lleva a cabo una reacción de PCR con los oligos del gen *rrs* de todas las muestras de RNA extraído, un control negativo (con agua DEPC) y un control positivo (con el DNA genómico de *M. aeruginosa* PCC 7806). Las condiciones de la reacción se encuentran descritas en el siguiente apartado.

2.14. Retrotranscripción del RNA a cDNA mediante transcriptasa inversa (RT-PCR)

Una vez confirmado que se dispone de RNA íntegro y libre de DNA, se obtienen los retrotranscritos de todos los mensajeros a cDNA. Para tener una representación completa de los transcritos de cada muestra se utilizaron “random primers” (oligonucleótidos en su mayoría hexámeros que hibridan al azar) de Invitrogen.

- I) Se preparó una mezcla inicial con 1µg de RNA total y 150 ng de “random primers”, diluido en el tampón de hibridación 1x (Tris-HCl 10 mM (pH 8), EDTA 1 mM, KCl 150 mM, en stock 10x) en agua DEPC hasta un volumen final de 10 µl.

La mezcla se sometió al siguiente programa de PCR: 10 minutos a 85°C para desnaturalizar el RNA y 1 h a 50°C para que tenga lugar la hibridación de los “random primers”.

- II) Pasado este tiempo se añadió a cada muestra: 1 µl de agua DEPC, 2 µl de una mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos (2.5 mM), 2 µl de DTT a 0.1 M y 4 µl de tampón 5x suministrado por la casa comercial. A continuación se añadió 1 µl con 200 U de la enzima retrotranscriptasa SuperScript™ de GibcoBRL.

La mezcla se sometió al siguiente programa del termociclador: 1 h de incubación a 47°C para que tenga lugar la extensión de los cebadores y, posteriormente, un calentamiento de las muestras a 75°C durante 15 min para detener la reacción.

El cDNA obtenido se guarda a 4°C durante 24 h y, pasado este tiempo, se conservan congeladas a -80°C.

2.15. Estudio de la amplificación del fragmento del gen *rrs* y otros genes de interés

Mediante la RT-PCR semicuantitativa se cuantifica la expresión de un retrotranscrito de un gen diana en diferentes condiciones, comparándolo con una muestra control. Se puede utilizar tanto para verificar cambios en la transcripción debido a diferentes condiciones de cultivo, como también cambios producidos por alguna mutación o sobreexpresión de determinados genes. Se utiliza un control interno para eliminar errores en la cantidad inicial de cDNA de cada muestra. Este control interno debe ser un gen constitutivo (housekeeping) que no presente cambios significativos de expresión en las condiciones propuestas.

Esta normalización de las muestras se hace con el gen de referencia durante la fase exponencial o logarítmica de amplificación, de modo que, todas las muestras presenten una misma cantidad en ng de cDNA que son ajustadas a distintos volúmenes de muestra. Pequeñas diferencias en la concentración inicial de cDNA generan efectos significativos que pueden revelar falsos resultados de cambios transcripcionales [101]. Para la determinación de la fase exponencial de amplificación, tanto del fragmento de 382pb del gen housekeeping *rrs* como de la secuencia de 282 pb presente en el gen *mcvD*, se utilizaron muestras de cDNA total obtenidas de células de *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 cultivadas en condiciones estándar.

Se realiza una mezcla que contenga: 1µl de muestra de cDNA total, con 0,4 mM dNTPs, 50nM de oligonucleótido, 3 mM MgCl₂, 1x Buffer de reacción y 2,5 unidades Taq DNA polimerasa recombinante (ambos de la casa comercial Biotools) y agua MillQ para enrasar a 25 µL de volumen final.

Se lleva a cabo una PCR utilizando el siguiente programa de amplificación (el mismo que se utilizó para analizar la presencia de DNA contaminante): 5 min a 95°C, 35 ciclos (para el gen *mcvD*) o 25 ciclos (para el gen *rrs*) de 3 etapas: desnaturalización 45 s a 95°C, hibridación de 45 s a 45°C (para el gen *mcvD*) o 47°C (para el gen *rrs*) y extensión 1min 30 s a 72°C. En esta etapa se recogieron muestras en los ciclos 20, 25, 28, 31 y 34 (para el gen *mcvD*) o 15, 17, 19, 22 y 25 (para el gen *RRS*). Para finalizar, se incubaron 7 min a 72°C y se pasaron a 4°C para mantenerlas hasta que se retiraban las muestras.

2.16. Normalización de las muestras de cDNA de diferentes condiciones de cultivo

Una vez determinada la fase exponencial, se llevaron a cabo reacciones de PCR en las mismas condiciones que las anteriores utilizando los cebadores del fragmento del gen RRS (Tabla 3) y comenzando con 1 µg de cDNA por muestra, hasta conseguir igualar cuantitativamente la cantidad de DNA amplificado en todas las muestras.

Para la normalización del gen de referencia se hicieron 17 ciclos de PCR utilizando las mismas condiciones descritas en el apartado anterior (1.18). Los volúmenes para los que el producto de amplificación daba resultados homogéneos variaron en un rango de 0,8 a 1,2 µL de las muestras de retrotranscripción.

2.17. Semicuantificación de los fragmentos de los genes: *mcvD*, *mcvH*, *mcvJ*, *ntcA*, *furA*, α -*furA* *furB* y *furC*

Tras tener todas las muestras normalizadas por el gen constitutivo, se cuantifica la expresión del gen diana en la fase exponencial de amplificación utilizando un programa del termociclador de 33 ciclos con los volúmenes ajustados de cada muestra [102], de esta forma, el resultado de la amplificación será representativo de los cambios en la transcripción ocasionados por los estreses a los que las células han sido sometidas. La temperatura de hibridación de la reacción variaba según los oligos utilizados.

Cebadores	Secuencia 5'→3'	Longitud cebador	Tm utilizada (°C)
<i>rrs</i> dir	caa gtc gaa cgg gaa tct tc	20	47
<i>rrs</i> rev	ctc aag tac cgt cag aac ttc	21	
<i>mcyD</i> dir	gag cat taa ggg cta aat cg	20	45
<i>mcyD</i> rev	ctt ggt tgc ttc atc aac tc	20	
<i>mcyJ</i> dir	gcc gaa gaa aca act tat aac g	22	48
<i>mcyJ</i> rev	cta tag cca agc ttc cac cgg g	22	
RT- <i>mcyH</i> up	ggt atg aat gca gca g	16	45
RT- <i>mcyH</i> dw	cgc ctg gtt cga tag g	16	
<i>ntcA</i> up	gga att cca tat gga ctt atc att aat aca aga taa ac	38	54
<i>ntcA</i> dw	ccc aag ctt tta agt aaa ttg ttg act gag ag	32	
<i>Mfur-N</i>	gtc gat cgc cca tgg ctg cct ac	23	50
<i>Mfur-C</i>	cag ttg gga att ccc gct tag atg	24	
<i>furDir</i>	cga cga ttt acc gca gtg	18	43
<i>furSC</i>	cac act gtt tga gac tgt g	19	
<i>furB</i> Myc1 dir	caa tct atg ggw yta gct acy gt	23	60
<i>furB</i> Myc1 rev1	ccg cai arw cca aaa aat tci ari gta tg	29	
<i>furC</i> Myc dir	cat yti tct gct m gig aaa ttt atg atc c	29	60
<i>furC</i> Myc rev	cat gig aat gig aat cig aaa tak twcc	28	

Tabla 4. Cebadores utilizados en el estudio de PCR semicuantitativa.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Estudio del efecto del lindano en *M. aeruginosa* PCC 7806

Este trabajo tiene por objetivo determinar el efecto ocasionado por el lindano sobre la producción de microcistina usando como modelo experimental *M. aeruginosa* PCC 7806. Se analizó su influencia a nivel de expresión génica y a nivel de producción de toxina. El lindano es un compuesto hidrófobo, por lo que para determinar el efecto de este pesticida se utilizó etanol como solvente, tal como estaba descrito en la literatura. Dado el efecto del solvente, que enmascaraba el efecto del lindano en sí, se llevó a cabo otra serie de experimentos en condiciones de saturación en agua, ya que resulta más fisiológico y responde a la situación real del compuesto en el medio ambiente.

3.1.1. Curva de tolerancia a lindano

Se analizó el crecimiento de *M. aeruginosa* PCC 7806 a distintas concentraciones de lindano con el objetivo de determinar la concentración más adecuada para el estudio. El seguimiento del crecimiento se realizó mediante la cuantificación del contenido de clorofila *a* de los cultivos, tal y como se explica en el apartado (2.3.) de materiales y métodos. Se llevaron a cabo estudios preliminares durante 10 días en los que se observó una gran volatilidad del lindano que no permitía alargar el experimento en el tiempo más allá de 24 horas (datos no mostrados). Se tomaron medidas a tiempo 0, 2, 8 y 24 horas.

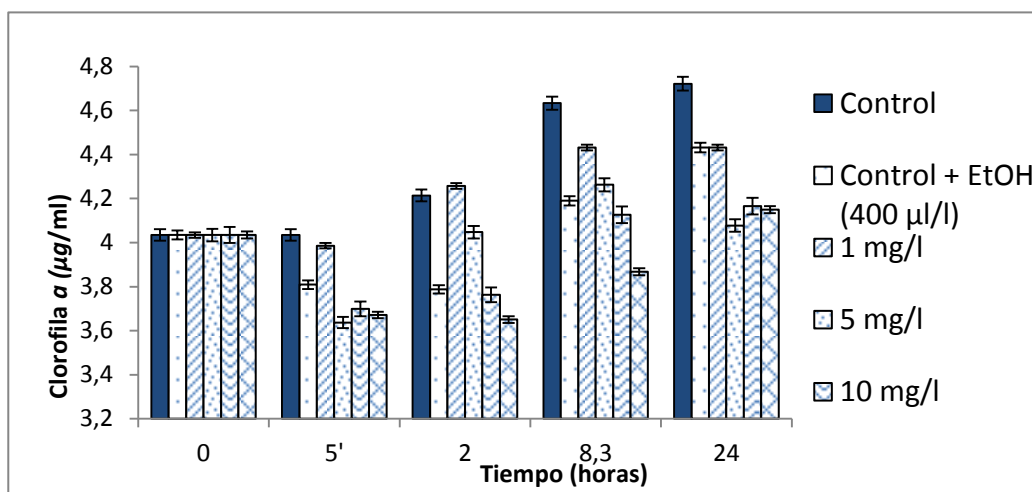


Figura 6. Crecimiento de *M. aeruginosa* PCC 7806 en presencia de distintas concentraciones de lindano con respecto al tiempo. En el eje y se representa la cantidad de clorofila que contiene cada cultivo en µg/l y en el eje x, el tiempo en horas de la toma de muestra.

En la imagen se observa una afección inmediatamente después de añadir el lindano. La evolución con el tiempo muestra que las concentraciones de lindano más bajas favorecen el crecimiento en un primer momento; es a partir de los 10 mg/l cuando *M. aeruginosa* PCC 7806 ve comprometido su crecimiento. Se observa también que el etanol, aun en muy bajas concentraciones, afecta al crecimiento.

3.2. Estudio del efecto de 10 mg/l de lindano en presencia de etanol

A la vista de los resultados anteriores se eligió 10 mg/l como concentración más adecuada para llevar a cabo el estudio del efecto del lindano sobre la síntesis de la toxina. Se realizó un seguimiento más detallado del crecimiento de *M. aeruginosa* PCC 7806 en presencia de la concentración de

pesticida seleccionada. Para ello, se midió la absorbancia a 700 nm, la cantidad de clorofila *a* y el número de células por mililitro.

3.2.1. Curva de crecimiento en presencia de lindano

3.2.1.1. Medida de la absorbancia a 700 nm

En primer lugar, se midió la absorbancia de los cultivos a una longitud de onda de 700 nm en distintos tiempos. El resultado fue el siguiente: (Figura 7)

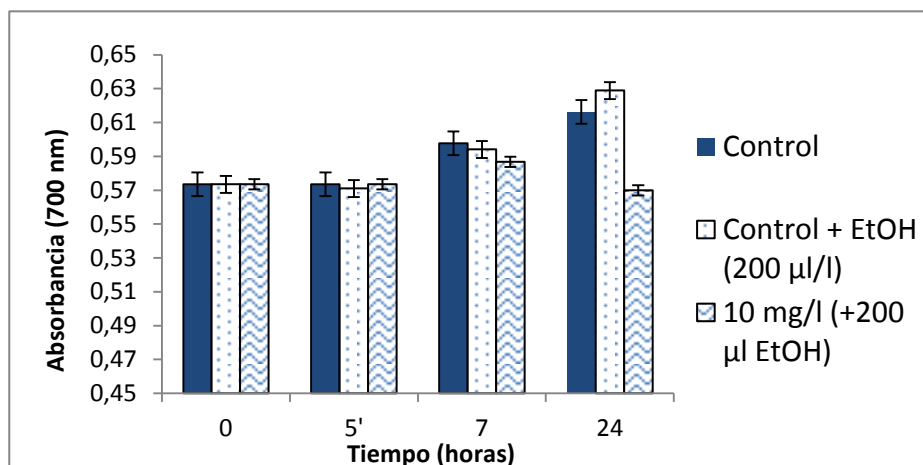


Figura 7. Medida de la absorbancia a 700 nm, representativa de la densidad óptica del cultivo con respecto al tiempo 0, 7 y 24 horas.

Se observa un aumento de la absorbancia del cultivo control con el tiempo, mientras que el cultivo tratado con lindano disminuye, alcanzando un mínimo a las 24 h. El control con el solvente ralentiza su crecimiento en un primer momento, pero se recupera posteriormente.

3.2.1.2. Medida de la cantidad de clorofila *a*

A continuación, se midió la clorofila *a* a tiempos: 0, 2, 7 y 24 horas, tanto de la muestra control como del control con etanol y del cultivo tratado con lindano disuelto en etanol.

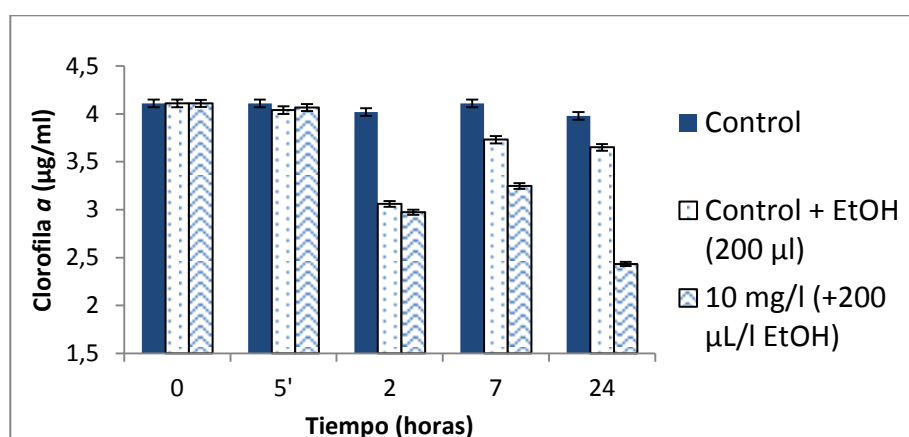


Figura 8. Se representan los niveles de clorofila *a* en µg/ml con respecto al tiempo.

Puede observarse el mismo descenso para el cultivo tratado con lindano que se veía en las medidas de absorbancia. De nuevo, el cultivo control al que se le ha añadido etanol sufre un primer descenso que se recupera a las 24 horas. Por tanto, los cultivos tratados con etanol y con lindano en etanol presentan un descenso en el crecimiento, que resulta más acentuado en el caso del lindano.

3.2.1.3. Recuento de número de células

Para completar los resultados obtenidos mediante la medida de la absorbancia y la clorofila a , se llevó a cabo el recuento celular de los tres cultivos a los diferentes tiempos utilizando la cámara de Neubauer. El resultado se muestra en la figura (9):

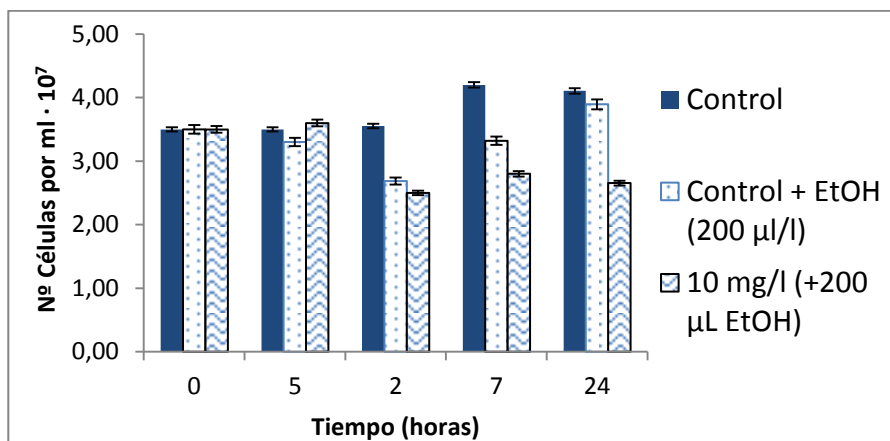


Figura 9. En la gráfica se muestra el número de células por mililitro de *M. aeruginosa* PCC 7806 en cada uno de los cultivos en función del tiempo.

Igual que para las medidas de clorofila a , se observa un descenso del crecimiento en el cultivo al que se le ha añadido el solvente y en el cultivo con lindano, más notable en el que ha sido tratado con el pesticida. Por tanto, los resultados de las tres mediciones realizadas para el seguimiento del crecimiento son coherentes entre sí. La absorbancia está muy influenciada por la turbidez de la disolución, lo que dificulta el uso de este método para el seguimiento.

3.2.2. Cambios morfológicos visualizables al microscopio óptico

Con el fin de visualizar el efecto que estaba causando el tratamiento en la morfología de las células, se observaron al microscopio óptico los cultivos: control y a las 4 horas del tratamiento con lindano en etanol. Se utilizó el objetivo 100x y aceite de inmersión, con un total de 1000 aumentos. Se obtuvieron las siguientes fotografías (figura 10):

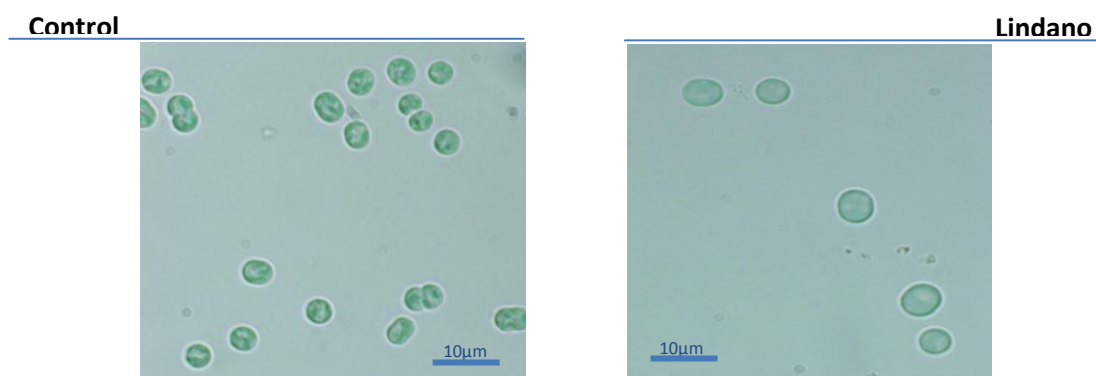


Figura 10. Se muestran las imágenes obtenidas al microscopio óptico del cultivo control y del cultivo tratado con lindano en etanol a las 4h de su adición.

Las células que han sido tratadas con lindano presentan un mayor tamaño; mientras las células sin tratar medían unos 3-4 µm de diámetro, las tratadas con el pesticida exhibían un diámetro de 5-6 µm aproximadamente. Congruentemente con los cambios cuantificados de clorofila a , las células

tratadas con lindano presentaban un color verde más pálido que las células control. En la imagen puede verse como las células tratadas han perdido la estructuración interna, se han modificado los tilacoides y las vesículas de gas que se observan en las células no tratadas, aunque mantuvieron su viabilidad a esta concentración. Las muestras fueron enviadas también a un colaborador que realiza microscopía electrónica y estamos pendientes de los resultados. En el caso del cultivo con etanol, los resultados fueron análogos al control (fotografía no mostrada).

3.2.3. RT-PCR. Puesta a punto y estudio de la fase exponencial de amplificación

El análisis de la expresión de un gen específico es una herramienta muy útil para entender los diferentes mecanismos celulares que se desencadenan en diferentes condiciones [102]. Las muestras con el RNA total de los distintos tiempos fueron cuantificadas mediante el equipo de nanoVue de modo que 1µg de RNA total de cada muestra fue retrotranscrito a cDNA. Para obtener todos los retrotranscritos de todos los mensajeros a cDNA, el RNA debe estar en óptimas condiciones, lo que se confirmó con el análisis en un gel de agarosa del 1%. Además, para que la prueba sea representativa, el RNA debe carecer de DNA genómico contaminante, ya que falsearía los resultados al realizar la reacción de PCR. Los resultados de estos controles se muestran en la figura 11.

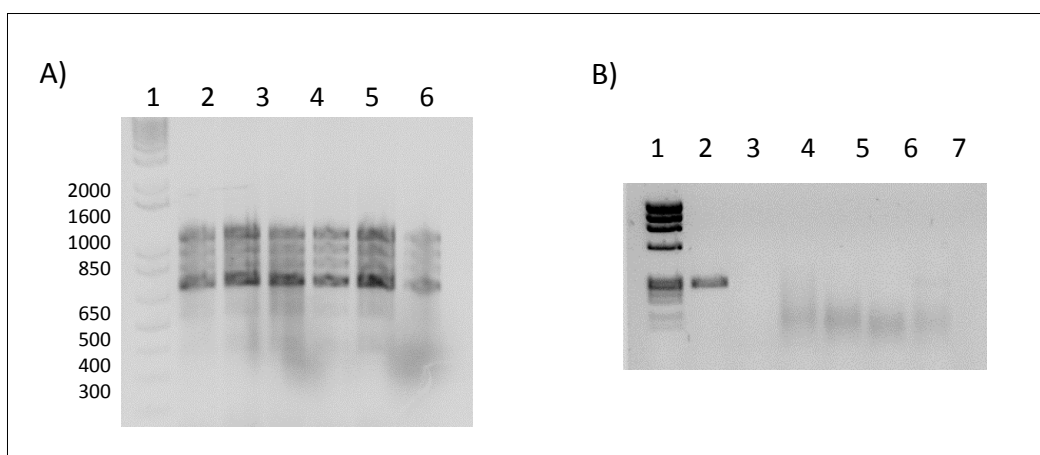


Figura 11. A) Análisis de la integridad del RNA obtenido en gel de agarosa del 1%. En el carril 1 se encuentra el marcador de pesos moleculares de 1Kb (Plus DNA Ladder), en el resto de los carriles están las muestras de RNA obtenidas tras la extracción. **B)** Control negativo de la presencia de DNA contaminante. El gel muestra el resultado de la amplificación del RNA obtenido. El carril 1 son los marcadores de pesos moleculares. El control positivo está situado en el carril 2, los carriles 3-7 muestran el producto de amplificación del fragmento del gen *mcyD*.

El RNA de las muestras extraídas presenta buen aspecto. Pueden distinguirse las bandas más significativas, lo que denota una buena integridad. En cuanto al control negativo de la presencia de DNA: el control positivo (DNA genómico de *M. aeruginosa* PCC 7806) sí que muestra banda de amplificación, mientras que el control negativo (agua DEPC) no muestra banda, ni los fragmentos digeridos del DNA que aparecen en las muestras. La ausencia de bandas en las muestras implica un RNA libre de DNA genómico contaminante. Las sombras que aparecen a pesos moleculares inferiores corresponde a los fragmentos de DNA genómicos digeridos por la DNasa I. Por tanto, el producto de esta amplificación no reflejó ninguna traza de DNA contaminando las muestras.

3.2.3.1. RT-PCR: Estandarización

En los estudios transcripcionales es imprescindible elegir un gen de referencia (“housekeeping”) cuya expresión no varíe en las condiciones de estrés estudiadas. La elección de un gen de expresión constitutiva no resulta una tarea fácil, incluso en el caso de eucariotas, donde se han estudiado y caracterizado ampliamente estos genes [103]. Estudios previos realizados en nuestro

grupo de investigación, determinaron el gen *rrs* (16S rRNA: AF139299) como housekeeping idóneo por presentar pocos cambios de expresión ante diferentes condiciones.

3.2.3.1.1. Determinación de la fase exponencial de la amplificación del housekeeping

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa utilizando 1 µg de cDNA y los cebadores que amplifican el gen de referencia, a distinto número de ciclos: 15, 17, 19, 22 y 25.

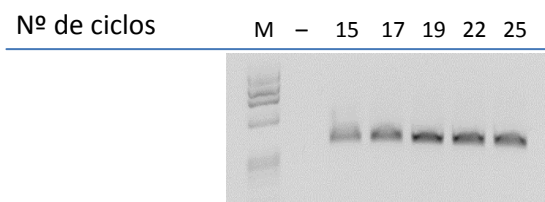


Figura 12. Estudio de la fase de amplificación del gen housekeeping. Para ello se realizan ciclos crecientes de la reacción en cadena de la polimerasa (15, 17, 19, 22 y 25).

El ciclo elegido como ciclo de fase logarítmica de la amplificación fue el 17, ya que a partir de éste se observaba una saturación de la amplificación de la muestra.

3.2.3.2. Expresión de genes del operon *mcy*

La normalización de todas las muestras de cDNA con el gen de referencia durante la fase logarítmica de la amplificación, evita las diferencias en la concentración inicial de cDNA que generan efectos significativos que pueden generar falsos resultados de cambios transcripcionales [104]. Tras tener todas las muestras normalizadas, de forma que presentan una misma concentración (que es ajustada a distintos volúmenes), se cuantifica la expresión de los genes diana en la fase exponencial de amplificación [102].

3.2.3.2.1. Estudio del gen *mcyD* como respuesta a lindano

En primer lugar, se estudia el gen *mcyD* del operon *mcy*. Este gen codifica para una policétido sintasa y fue seleccionado por ser uno de los miembros del operon *mcy* cuya expresión es indispensable para la síntesis de microcistina ya que es el primero en transcribirse, junto con *mcy A*, por flanquear ambos al promotor bidireccional. Además, es el responsable de la incorporación del grupo Adda, responsable de la toxicidad de la molécula [27]; [26]. Es un gen considerado como marcador [105], [37], [106].

3.2.3.2.1.1. Fase exponencial de amplificación del gen *mcyD*

Se debe hacer un estudio individual de la fase exponencial, tanto para el gen “housekeeping” como para el gen diana, y determinar el ciclo en que se encuentra la fase logarítmica de la amplificación para evitar posibles errores por saturación de la amplificación.

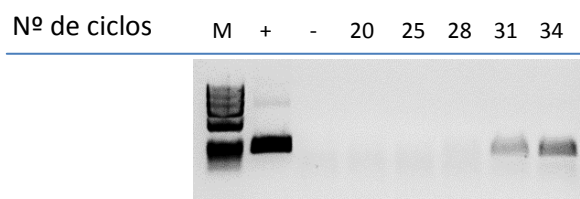


Figura 13. En la figura se observa el producto de la PCR en diferente número de ciclo de amplificación, indicado en la imagen (20, 25, 28, 31 y 34 ciclos,) para la secuencia del gen *mcyD*.

A la vista de los resultados se eligió el ciclo 32 como número de ciclo en que el gen *mcyD* se encuentra en la fase exponencial. Es un gen de baja expresión y requiere un número de ciclos elevado.

3.2.3.2.1.2. Expresión de *mcyD* como respuesta a lindano

Tras estandarizar el housekeeping *rrs*, se lleva a cabo la reacción en cadena de la polimerasa amplificando durante 32 ciclos. El gen *mcyD* codifica una policétido sintasa y es indispensable para la síntesis de microcistina [27]; [26], es el primero en transcribirse en uno de los sentidos del promotor bidireccional. Además, el gen *mcyD* es uno de los responsables de la síntesis de Adda, que se ha constatado es fundamental en la interacción con la proteína fosfatasa y por tanto vital para la inhibición de la misma y la toxicidad, es común en microcistinas y nodularinas. El resultado se muestra en la figura 14.

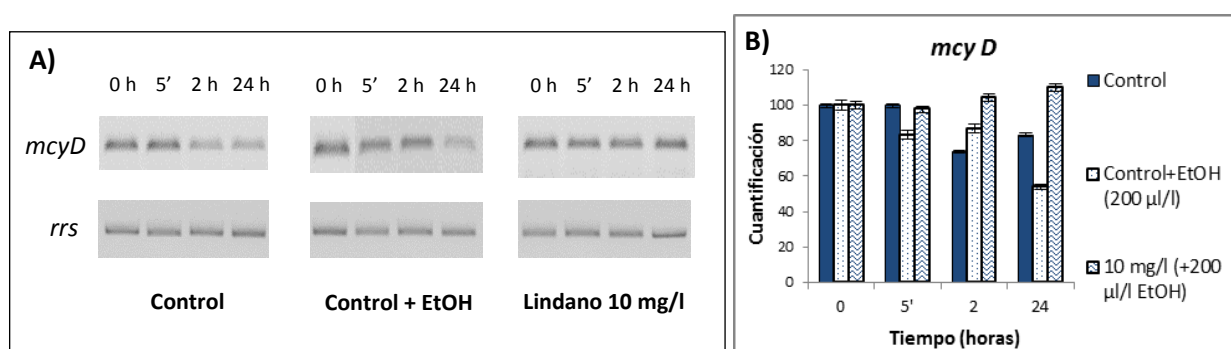


Figura 14. En el panel A) se representa el producto de amplificación del fragmento del gen *mcyD* para las muestras control, control con etanol y cultivo tratado con lindano a los distintos tiempos. En el panel B) se representa la cuantificación, considerando la lectura a tiempo 0h como el 100 % de la señal y se normalizaron el resto de los resultados con respecto a la señal detectada.

Para tener una idea más exacta del resultado, se llevó a cabo la cuantificación de las bandas en el equipo GelDoc 2000 de BioRad; la imagen se integró y analizó con el programa Multi-Analyst® 1.1 (Bio-Rad Laboratories, 1997). El resultado se muestra en la figura 14. Se observa un descenso de la expresión del gen *mcyD* con el tiempo en los cultivos control y control con etanol. Sin embargo, el cultivo tratado con lindano aumenta su expresión, alcanzando niveles máximos a las 24 horas.

3.2.3.2.2. Expresión de *mcyH* como respuesta a lindano

El gen *mcyH* del operon *mcy* codifica un transportador ABC, asociado con la salida al exterior de la microcistina. La microcistina extracelular se considera que en condiciones normales puede ser hasta un 10 % de la cantidad de microcistina total.

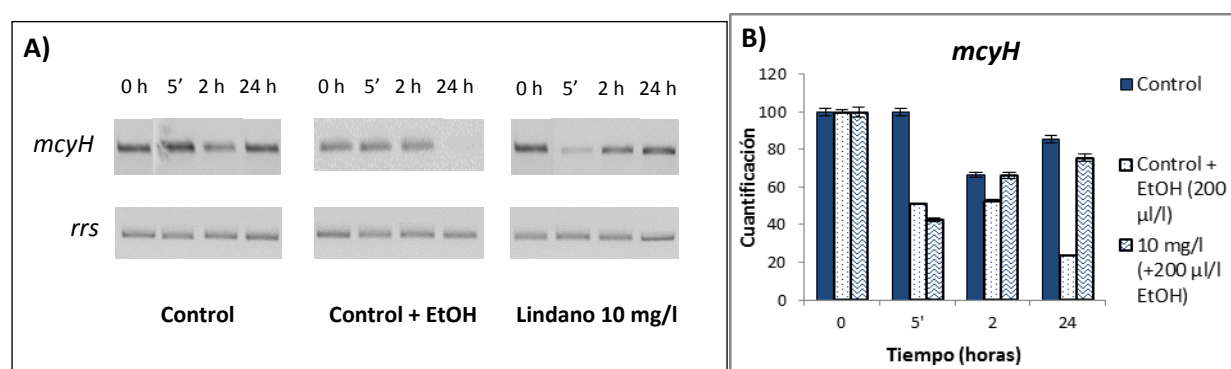


Figura 15. En el panel A) se representa el producto de amplificación del fragmento del gen *mcyH* para las muestras control, control con etanol y cultivo tratado con lindano a los distintos tiempos. En el panel B) se

representa la cuantificación, considerando la lectura a tiempo 0h como el 100 % de la señal y se normalizaron el resto de los resultados con respecto a la señal detectada.

Para ayudar a la visualización del resultado, se cuantificaron las muestras del mismo modo que en el caso anterior, representándose los resultados en el diagrama de barras (figura 15); No se observa una variación apreciable en las células tratadas con lindano. El control con etanol disminuye a las 24 horas.

3.2.3.2.3. Expresión de *mcyl* como respuesta a lindano

La elección del gel *mcyl* del operon *mcyl* se debió a la presencia de regiones de unión para reguladores transcripcionales como Fur y NtcA en su promotor, que podrían estar modulando la síntesis de microcistina. También se demostró que el mutante $\Delta mcyl$ es el único que produce niveles detectables de microcistina [29]. Se han observado regiones de unión a proteínas implicadas en la regulación, como Fur o NtcA.

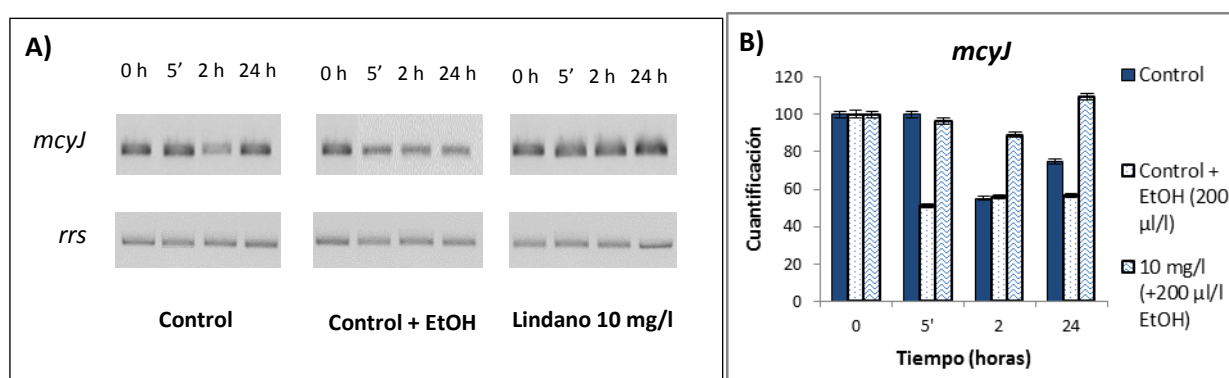


Figura 16. En el panel A) se representa el producto de amplificación del fragmento del gen *mcyl* para las muestras control, control con etanol y cultivo tratado con lindano a los distintos tiempos. En el panel B) se representa la cuantificación, considerando la lectura a tiempo 0h como el 100 % de la señal y se normalizaron el resto de los resultados con respecto a la señal detectada.

El gen *mcyl* presenta una mayor expresión que los genes *mcylD* y *mcylH*. Se aprecia un claro aumento en la expresión de las células tratado con lindano transcurridas 24 horas del tratamiento. Sin embargo, la amplificación puede estar saturado en este caso, por lo que este resultado debe ser considerado con precaución.

3.2.3.3. Expresión de genes de reguladores transcripcionales del operon *mcyl*

Estudios previos del grupo han mostrado que NtcA y Fur pueden regular la expresión del operon *mcyl* [37], (Kusiyoshi et al, 2012). Previamente se ha descrito la presencia de secuencias consenso en los promotores *mcyl*, tanto en el bidireccional como en alguno interno, como es el caso de *mcylJ* [37], (Kusiyoshi et al, 2012). Para comprobar si el tratamiento con lindano estaba aumentando la expresión de los genes reguladores *ntcA* y *fur* se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa utilizando los cebadores que amplifican fragmentos de estos genes. El resultado se detalla en los apartados siguientes:

3.2.3.3.1. Expresión de *ntcA* como respuesta a lindano

La proteína NtcA está considerada el regulador global del metabolismo del nitrógeno. Se ha descrito que activa de promotores de genes relacionados con la adquisición de este nutriente, en ausencia de amonio [35]. A continuación, se muestra el resultado de la reacción en cadena de la polimerasa para el fragmento del gen *ntcA* (figura 17):

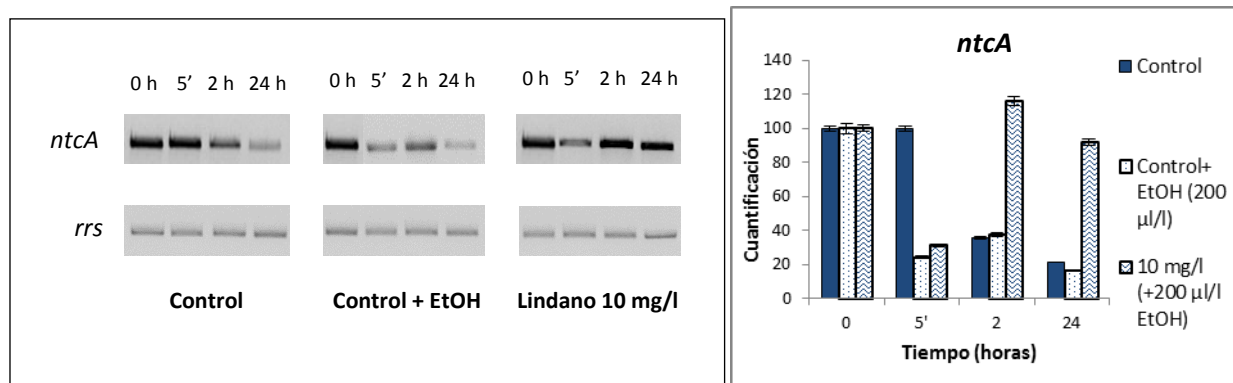


Figura 17. En el panel A) se representa el producto de amplificación del fragmento del gen *ntcA* para las muestras control, control con etanol y cultivo tratado con lindano a los distintos tiempos. En el panel B) se representa la cuantificación, considerando la lectura a tiempo 0h como el 100 % de la señal y se normalizaron el resto de los resultados con respecto a la señal detectada.

Algunas de las muestras se encuentran saturadas debido al elevado nivel de expresión del gen, pero aún así el resultado es claro: las muestras tratadas con lindano aumentan la expresión a las 24 horas. En los cultivos control y control con etanol muestran un descenso en la intensidad de la señal a tiempos 2 y 24 horas. Sin embargo, el cultivo tratado con lindano aumenta considerablemente la expresión en estos mismos tiempos. Debido a la saturación de las muestras, la cuantificación hay que considerarla con precaución.

3.2.3.3.2. Expresión de *fur* como respuesta a lindano

La familia Fur son reguladores transcripcionales que responden a la disponibilidad de hierro, y otros metales. Se ha estudiado la expresión de los tres parálogos presentes en *M. aeruginosa* PCC 7806. En el caso de *furA*, también se ha analizado la expresión de un RNA antisentido.

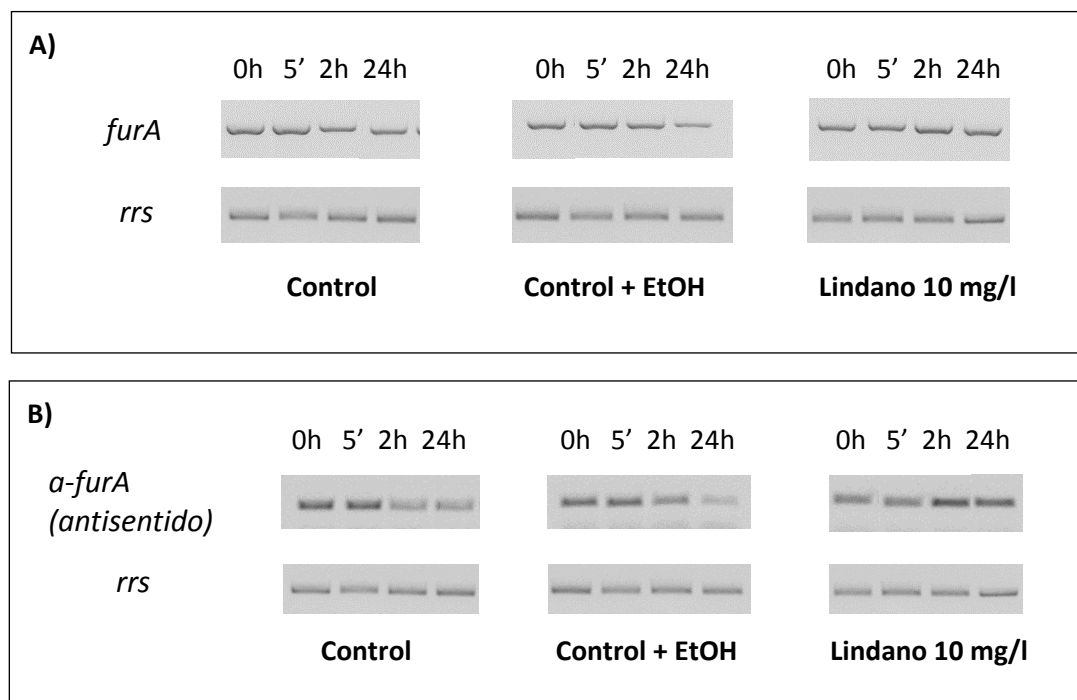


Figura 18. A) Se representa el producto de amplificación del fragmento del gen *furA* para las muestras control, control con etanol y cultivo tratado con lindano a los distintos tiempos. B) Se representa el producto de amplificación del RNA antisentido de *furA* para las mismas muestras.

Se observa una ligera inducción de *furA* a las 2 y 24 horas en las células tratadas con lindano respecto a las células control. El cultivo con etanol está disminuyendo su expresión a las 24 horas. En el caso del RNA antisentido, se observa un comportamiento similar; las células tratadas con lindano están aumentando la expresión del RNA antisentido con respecto al control; este transcrito actúa como represor del RNA del gen *furA*, impidiendo su traducción. De nuevo, el control encuentra disminuida su expresión a las 24 horas.

A continuación, se muestra el resultado de la amplificación de los parálogos de *furA*: *furB* y *furC*. (Figura 19):

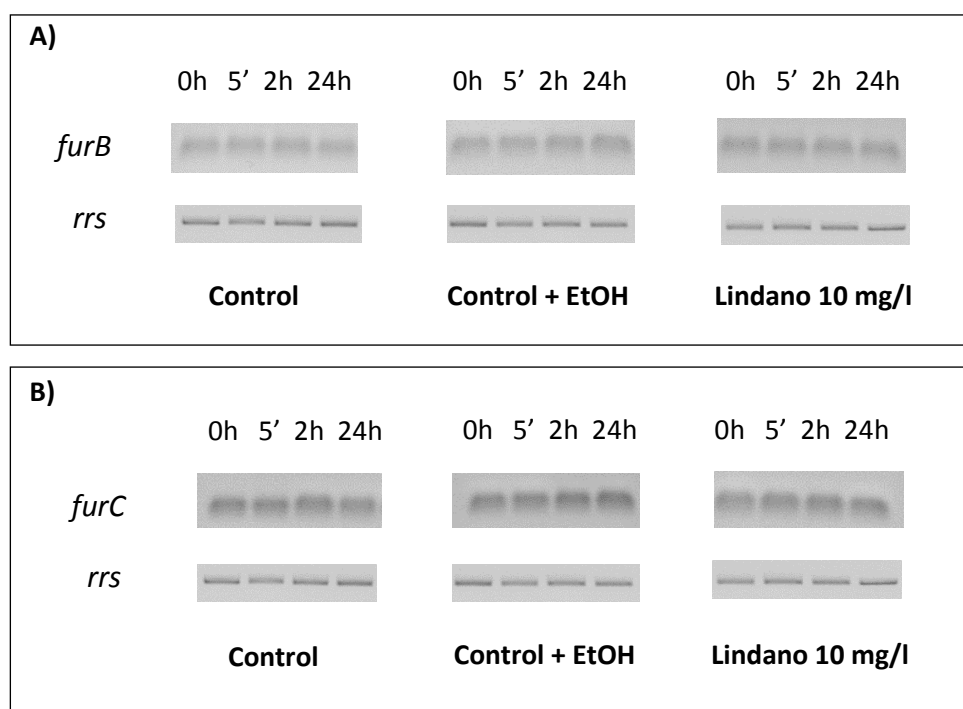


Figura 19. A) Se representa el producto de amplificación del fragmento del gen *furB* para las muestras control, control con etanol y cultivo tratado con lindano a los distintos tiempos. **B)** Se representa el producto de amplificación del fragmento del gen *furC* para las mismas muestras a los distintos tiempos.

Tanto en el caso de *furB* como en el parálogo *furC*, el resultado no muestra diferencias apreciables en el nivel de expresión. No se ha llevado a cabo la cuantificación de los genes de la familia Fur porque no se estaban observando variaciones significativas en la cantidad de RNA mensajero.

3.2.4. Cuantificación de los niveles de microcistina

Con el objetivo de completar el estudio, se determinó si el estrés por lindano también estaba afectando a nivel de producción de toxina. Para ello, se determinó la cantidad de microcistina-LR de los cultivos control, etanol y lindano en etanol mediante el kit de inhibición de la enzima proteína fosfatasa 2A. Este método determina microcistinas totales, como utilizamos cultivos de *M. aeruginosa* PCC 7806, que produce en un 99.8 % microcistina-LR, consideramos que la cantidad de microcistina total se corresponde con microcistina-LR. El objetivo de este análisis era determinar si el aumento de expresión observado en la RT-PCR se traducía en un aumento en la cantidad de toxina sintetizada. El resultado obtenido se observa en la figura 20.

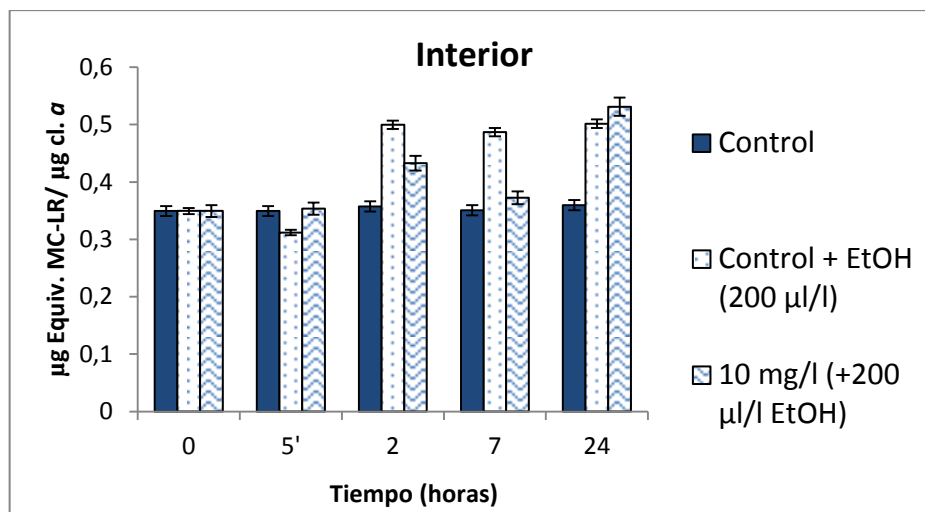


Figura 20. Cuantificación de la microcistina del interior celular en μg referida a la concentración de clorofila α .

Se puede apreciar un aumento en la cantidad de microcistina en el cultivo con etanol y un aumento en las células tratadas con lindano que adquiere importancia a las 24 horas. El 10% de la microcistina producida se exporta al exterior celular; se retiró el sobrenadante para extraer la microcistina externa. El resultado se muestra en la figura 21:

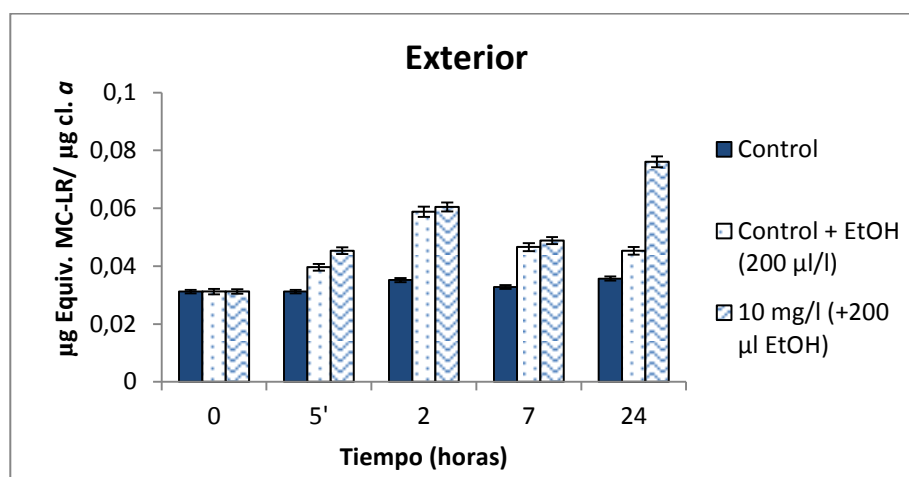


Figura 21. Cuantificación de la microcistina del exterior celular en μg referida a la concentración de clorofila α .

En el caso del cultivo tratado con lindano los niveles de microcistina exterior son más elevados que los medidos en el cultivo control a partir del momento en que la célula es sometida a la nueva condición de estrés, por lo que estas células están produciendo mayores cantidades de toxina que el cultivo control. El cultivo con etanol presenta también niveles de microcistina exterior superiores a los del cultivo control, aunque algo más bajos que los obtenidos para el cultivo con lindano.

3.3. Efecto del lindano en solución acuosa

Aunque utilizamos las condiciones estándar descritas en la literatura para otros estudios, se observó que el etanol utilizado para disolver el lindano también estaba ocasionando cambios en las células. Con el objetivo de determinar su efecto real sobre la población de cianobacterias, de un modo semejante a la situación en el medio ambiente, se llevó a cabo el experimento en ausencia de solvente. Para este estudio se consultó en bases de datos la solubilidad del lindano en agua y se redujo la concentración de lindano a niveles de saturación en agua que son 7 mg/l (CAS 58-89-9).

El seguimiento del crecimiento en este estudio se llevó a cabo mediante la medida de clorofila *a* del cultivo control y del cultivo tratado con el pesticida a tiempo 0, 2, 7 y 24 horas.

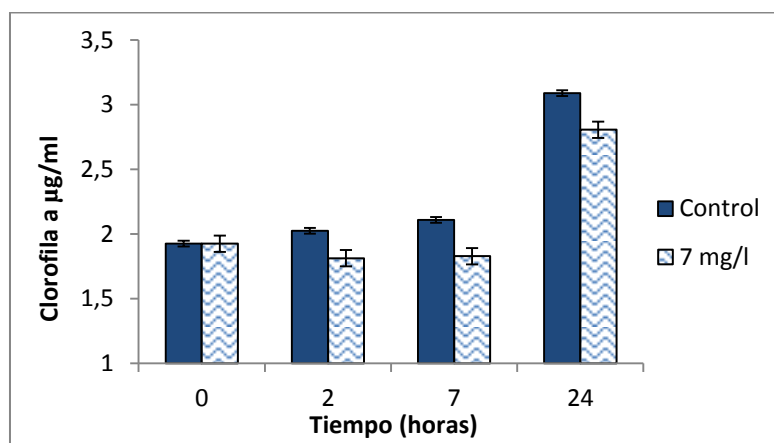


Figura 22. Cantidad de clorofila *a* en µg/ml respecto al tiempo en horas.

El cultivo que ha sido tratado con lindano presenta un descenso en el crecimiento a tiempos cortos, que se va recuperando lentamente conforme transcurren las horas. Las células se encuentran afectadas en menor medida que lo observado con 10 mg/l de lindano en etanol.

3.3.1. Efecto del lindano sobre algunos parámetros fisiológicos

Con objeto de tener una idea más detallada del efecto que tiene el lindano sobre la célula, se analizaron las variaciones que sufrían proteínas características de las cianobacterias, como son los carotenoides y las ficobiliproteínas.

3.3.1.1. Efecto sobre los carotenoides

En organismos fotosintéticos los carotenoides desempeñan un papel vital en los centros de reacción, ya sea participando en el proceso de transferencia de energía, o protegiendo el centro de reacción contra la acción fotooxidadora de la luz solar.

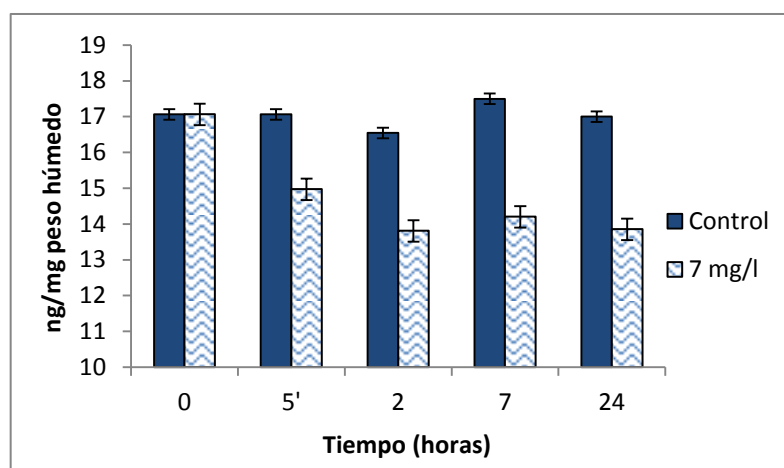


Figura 23. Contenido en carotenoides en ng de las muestras tomadas a los distintos tiempos referidas a mg de peso húmedo para el cultivo control y el cultivo tratado con lindano.

Se observa un descenso brusco de estos pigmentos al añadir lindano al cultivo. La bajada en el contenido de carotenoides es prácticamente inmediata, y no se recupera con el tiempo. Esto implicaría una disminución de las defensas ante la fotooxidación de estas cianobacterias.

3.3.1.2. Efecto sobre las ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas se encuentran en el espacio intertilacoidal formando complejos multimoleculares muy eficientes para captar la energía solar y transmitirla al centro de reacción del fotosistema II [107]; [108]. También se consideran una importante fuente de nitrógeno, que las cianobacterias utilizan cuando hay déficit de este nutriente [109]. El resultado del estudio se muestra en la figura 24, y muestra que al cabo de 24 horas se produce un acusado descenso de estas proteínas.

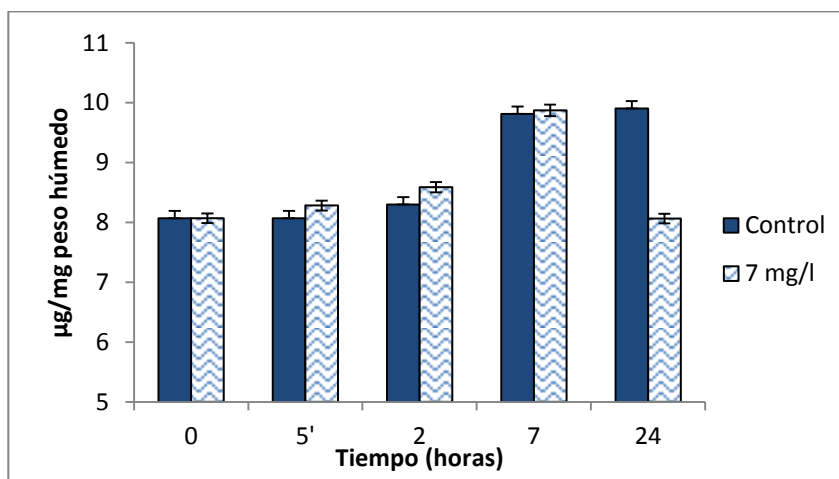


Figura 24. Contenido en ficobiliproteínas en µg de las muestras tomadas a los distintos tiempos referidas a mg de peso húmedo para el cultivo control y el cultivo tratado con lindano.

Se observa un descenso en el contenido de ficobiliproteínas a las 24 horas con respecto al cultivo control. El hecho de que las células tratadas con lindano no se vean afectadas a tiempos cortos, y sí al cabo de 24 horas, podría indicar que las ficobiliproteínas han sido utilizadas como fuente de nitrógeno.

3.3.1.3. Producción de radicales libres de oxígeno

Los radicales libres de oxígeno se forman abundantemente en los procesos de respiración y fotosíntesis, además, el lindano puede producir radicales libres de oxígeno. Se consideró interesante estudiar la presencia de radicales libres de oxígeno en ambos tipos de células, tratadas y control, para poder relacionar los efectos con la disminución de carotenoides observada.

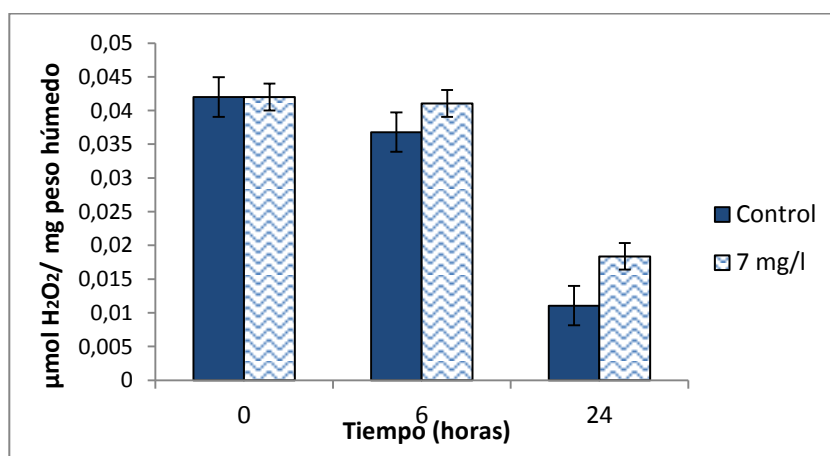


Figura 25. Se representa µmoles de H₂O₂ producidos con respecto al tiempo. Se ve aumentada la producción en el cultivo tratado con lindano.

La producción de radicales libres de oxígeno estaba ligeramente aumentada en las condiciones de estrés por lindano con respecto al control, pero era menor que en la situación inicial.

3.3.2. Efecto del lindano sobre la expresión de algunos genes del operon *mcy*

Con objeto de observar el efecto del lindano en sí mismo, se llevó a cabo el estudio de la expresión de genes *mcy* en las alícuotas de las muestras en saturación de lindano, 7 mg/l y sin lindano.

3.3.2.1. Expresión de *mcyD* como respuesta a la presencia de lindano

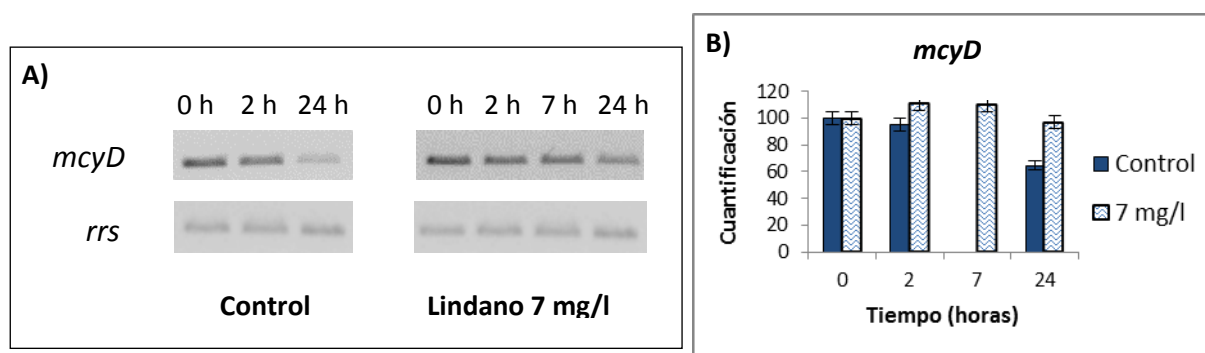


Figura 26. En el panel A) se muestran los productos de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa para el gen *mcyD* en tres tiempos para los controles y en cuatro tiempos para las muestras tratadas con una concentración de lindano de 7 mg/l. En el panel B) se muestra la cuantificación, considerando la lectura a tiempo 0h como el 100 % de la señal y se normalizaron el resto de los resultados con respecto a la señal detectada.

En ambos casos, puede verse un descenso de la expresión génica del gen *mcyD* con el tiempo. Sin embargo, las muestras tratadas con lindano no disminuyen en la misma medida que las muestras control, ya que el gen se encuentra más expresado a las 24 horas que en la muestra control. La cuantificación de las bandas mediante el equipo GelDoc permite apreciar con mayor claridad el aumento de expresión del gen *mcyD* al tratar el cultivo con lindano, en referencia al control sin lindano.

3.3.2.2. Expresión de *mcyH* como respuesta a lindano

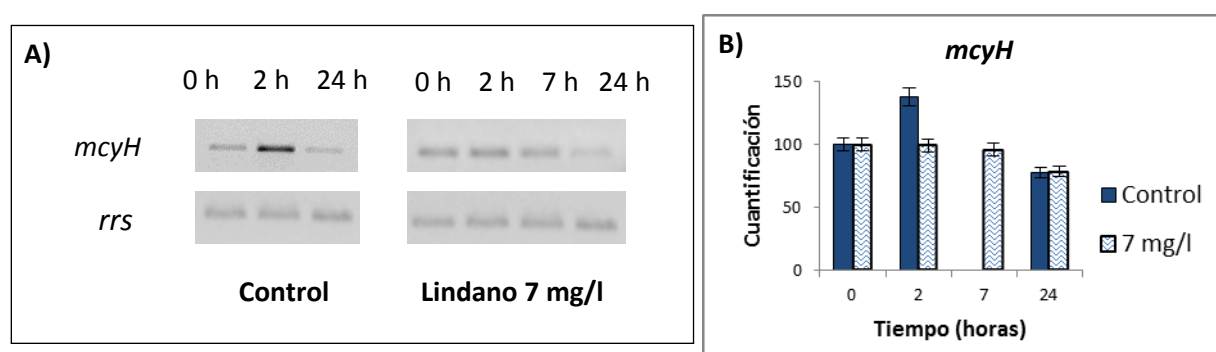


Figura 27. En el panel A) se muestran los productos de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa para el gen *mcyH* en tres tiempos para los controles y en cuatro tiempos para las muestras tratadas con una concentración de lindano de 7 mg/l. En el panel B) se muestra la cuantificación, considerando la lectura a tiempo 0h como el 100 % de la señal y se normalizaron el resto de los resultados con respecto a la señal detectada.

Se observa un descenso de la expresión con el tiempo en los dos cultivos. La cuantificación de las bandas muestra niveles similares de expresión a las 24 horas para el cultivo control y las células tratadas con lindano. El comportamiento es similar para ambos cultivos, los niveles de expresión del transportador a las 24 horas son análogos.

3.3.2.3. Expresión de *mcyJ* como respuesta a la presencia de lindano

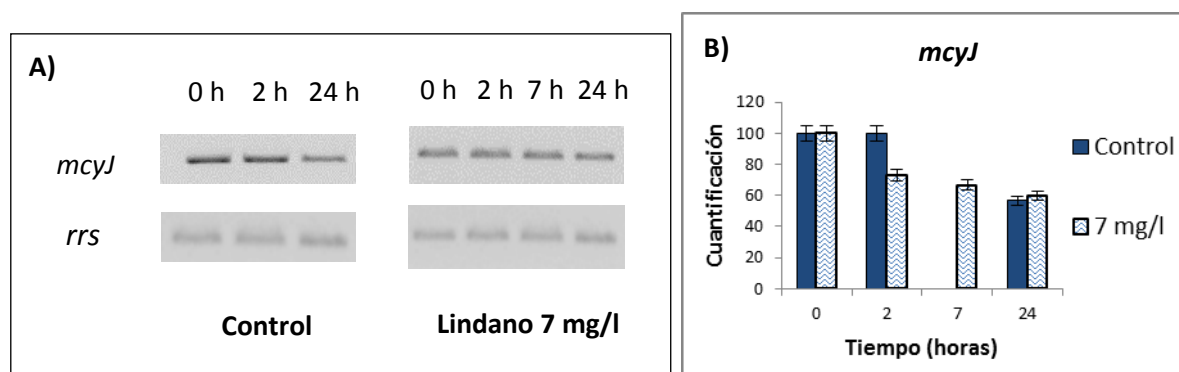


Figura 28. En el panel A) se muestran los productos de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa para el gen *mcyJ* en tres tiempos para los controles y en cuatro tiempos para las muestras tratadas con una concentración de lindano de 7 mg/l. En el panel B) se muestra la cuantificación, considerando la lectura a tiempo 0h como el 100 % de la señal y se normalizaron el resto de los resultados con respecto a la señal detectada.

Se observa un descenso con el tiempo de la expresión del gen *mcyJ* en ambos casos.

En la figura 28 se cuantifica la lectura de la densidad óptica del gel, que proporciona resultados similares para el cultivo control y las células tratadas con el pesticida.

3.3.2.3.1. Expresión de *ntcA* como respuesta a lindano

En este caso, sólo analizamos la expresión del gen responsable de la síntesis del regulador global del nitrógeno, ya que no observamos que una concentración de lindano más elevada a la utilizada en este momento estuviera afectando a Fur significativamente.

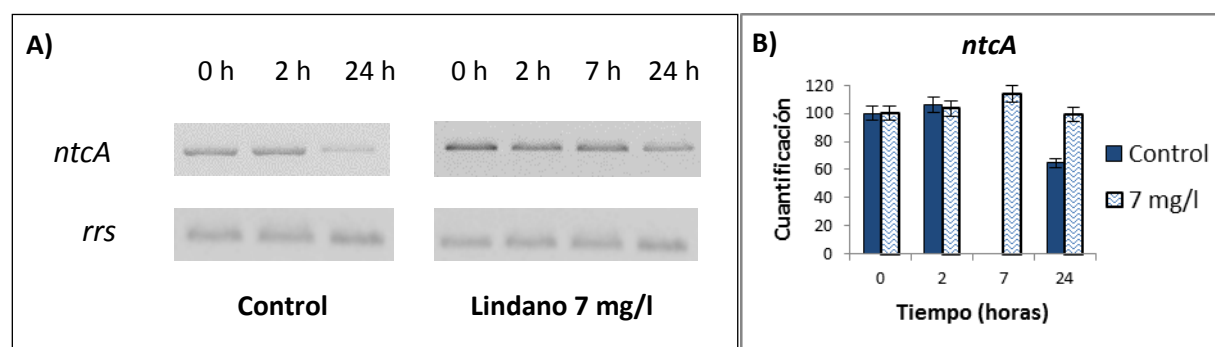


Figura 29. En el panel A) se muestran los productos de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa para el gen regulador *ntcA* en tres tiempos para los controles y en cuatro tiempos para las muestras tratadas con una concentración de lindano de 7 mg/l. En el panel B) se muestra la cuantificación, considerando la lectura a tiempo 0h como el 100 % de la señal y se normalizaron el resto de los resultados con respecto a la señal detectada.

Se observa un descenso en la expresión del gen con el tiempo. No se ve una afectación tan clara como en el experimento anterior, pero sí que parece que la expresión en las muestras tratadas con lindano es, en general, algo superior que en el control. La cuantificación muestra valores superiores para el cultivo con lindano.

3.3.3. Cuantificación de los niveles de microcistina

Para completar el estudio, igual que en el experimento anterior, se determinó si el estrés estaba afectando también a la producción de la toxina. Para ello, se determinó la cantidad de

microcistina-LR de los cultivos control y con lindano mediante el kit de inhibición de la enzima proteína fosfatasa 2A. El objetivo de este análisis era determinar si el aumento de expresión observado en la RT-PCR se traducía en un aumento en la cantidad de toxina sintetizada eliminando el efecto causado por el etanol. El resultado obtenido se observa en la figura 30:

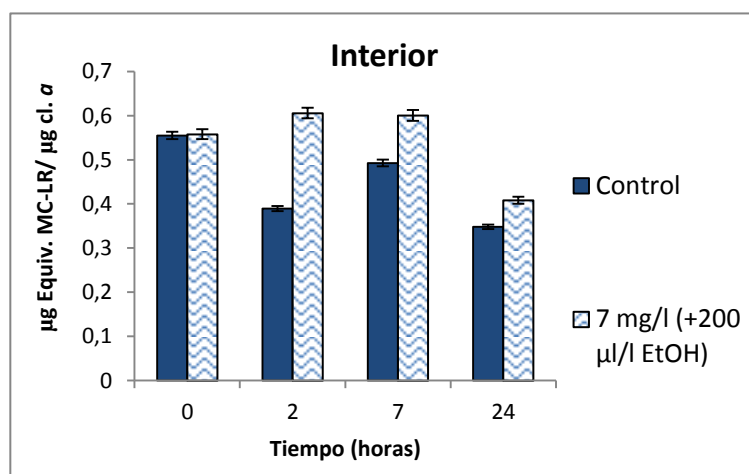


Figura 30. Medida del contenido de microcistina intracelular expresada en µg equivalentes de microcistina-LR por µg de clorofila *a* con respecto al tiempo en horas.

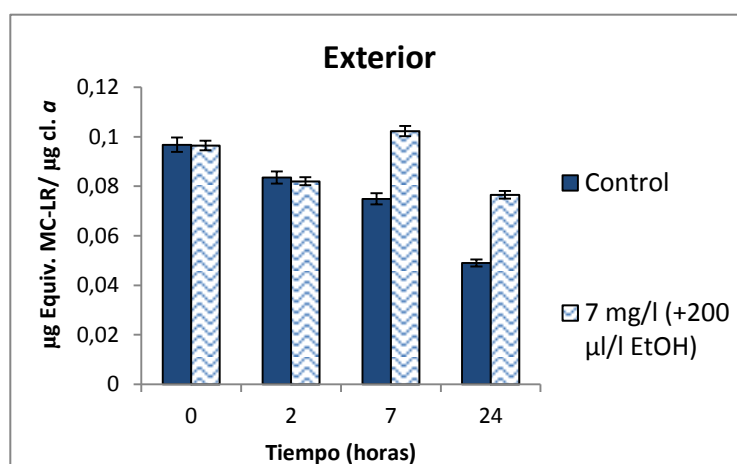


Figura 31. Medida del contenido de microcistina extracelular expresada en µg equivalentes de microcistina-LR por µg de clorofila *a* con respecto al tiempo en horas.

La cantidad de microcistina tanto intracelular como extracelular presenta niveles más altos para el cultivo tratado con lindano que para el cultivo control, igual que se observaba en el experimento en que se utilizaba el solvente.

3.4. Efecto de otros contaminantes emergentes sobre los niveles de microcistina en *M. aeruginosa* PCC 7806

En los últimos años están detectándose sustancias en cantidades importantes que hasta ahora habían pasado desapercibidas. En este estudio se ha analizado el efecto del benceno, solvente orgánico, y algunos de los fármacos más abundantes en nuestras aguas en los niveles de microcistina de *M. aeruginosa* PCC 7806. El objetivo era determinar si este tipo de contaminantes estaba afectando a la toxicidad de los blooms, cada vez más frecuentes en nuestras aguas debido a la creciente eutrofización.

3.4.1. Efecto del benceno

El benceno es un hidrocarburo aromático que se encuentra en la lista de los 20 productos químicos de mayor volumen de producción. Algunas industrias usan el benceno como punto de partida para manufacturar otros productos químicos. Se han estudiado dos concentraciones distintas: 50 $\mu\text{g/l}$ y 100 $\mu\text{g/l}$, que se escogieron basándose en los niveles encontrados en algunos de los ríos españoles [110].

3.4.1.1. Medida de la cantidad de clorofila a

Para estudiar el efecto sobre el crecimiento de *M. aeruginosa* PCC 7806 se llevaron a cabo medidas de la cantidad de clorofila a a tiempos 0, 1, 2, 3 y 4 días. El experimento no se pudo alargar más en el tiempo debido a la volatilidad del benceno. El resultado se muestra en la siguiente figura 32:

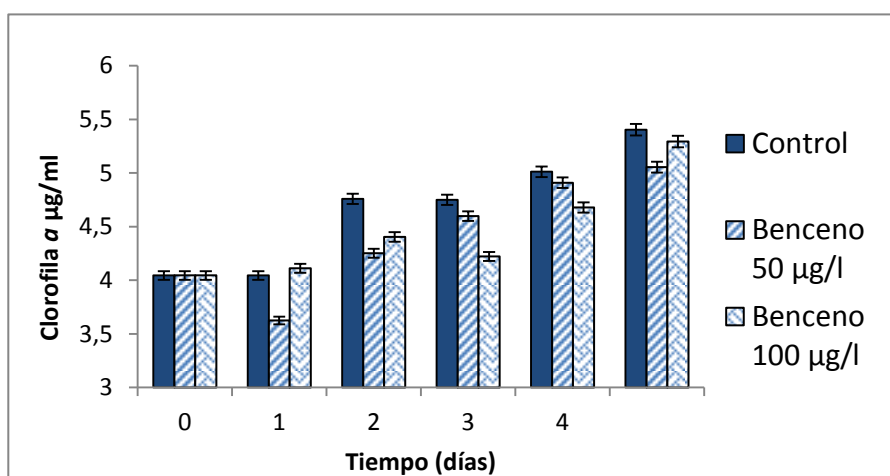


Figura 32. Cantidad de clorofila a medida en los tres cultivos con respecto al tiempo en días.

Se observa una ralentización del crecimiento en los cultivos tratados con benceno con respecto al cultivo control. Posteriormente, los cultivos se recuperan gracias a la volatilidad del benceno.

3.4.1.2. Medida de la cantidad de microcistina

Se midió el contenido en microcistina intracelular de los distintos cultivos a tiempo 0 y 4 días. El resultado se muestra en la figura 33:

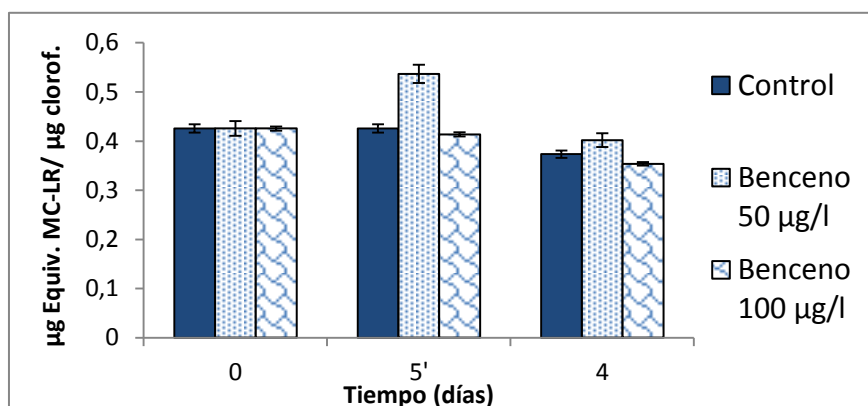


Figura 33. Representación del contenido de microcistina intracelular expresada en μg equivalentes de microcistina-LR por μg de clorofila a con respecto al tiempo en horas.

Se observa una ligera estimulación de la síntesis de microcistina en el cultivo tratado con 50 $\mu\text{g/l}$ de benceno con respecto al control. El cultivo con 100 $\mu\text{g/l}$ de benceno presenta un pequeño descenso en la cantidad de microcistina a los 4 días. Sin embargo, no consideramos que el efecto sea relevante.

3.4.2. Efecto de distintos fármacos

Entre los fármacos más habituales en nuestras aguas se encuentran: el paracetamol, el ibuprofeno, el atenolol o el voltarén. Se ha llevado a cabo el estudio del crecimiento de *M. aeruginosa* PCC 7806 en presencia de concentraciones de estos fármacos reales en nuestros ríos, y el análisis de la cantidad de microcistina producida. En todos los casos se realizó el seguimiento del crecimiento de la cianobacteria mediante medidas de la cantidad de clorofila a , y se llevó a cabo la cuantificación de la microcistina intracelular producida.

3.4.2.1. Paracetamol

Datos en la literatura describen que el paracetamol aparece en nuestras aguas con concentraciones en torno a 16 $\mu\text{g/l}$ [111]. Se estudió un rango más amplio de concentraciones, con 14 $\mu\text{g/l}$ como mínima y 166 $\mu\text{g/l}$ de máxima.

3.4.2.1.1. Medida de la cantidad de clorofila a

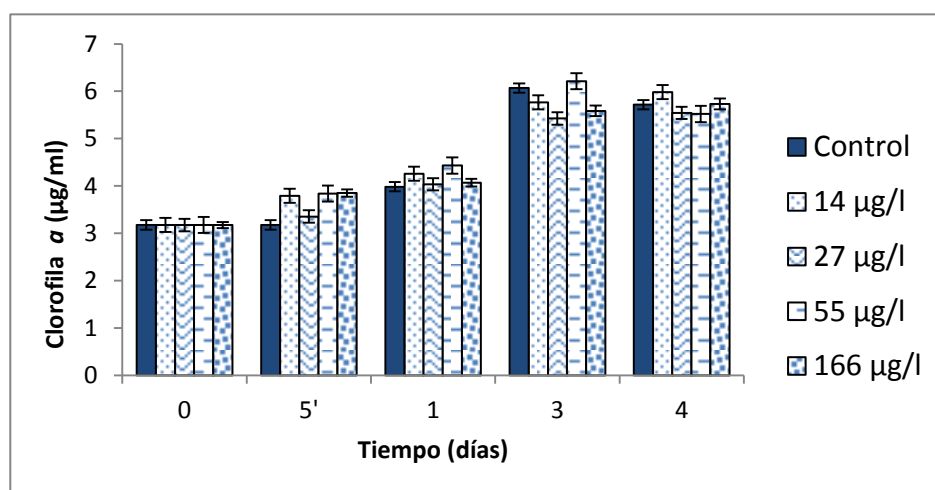


Figura 34. Representación de la cantidad de clorofila a de los diferentes cultivos sometidos a distintas concentraciones de paracetamol con respecto al tiempo en días.

No se observan cambios en el crecimiento significativos.

3.4.2.1.2. Medida de la cantidad de microcistina

Se determinó la cantidad de microcistina intracelular a tiempo 0 y 4 días para todas las concentraciones estudiadas. El resultado se muestra en la figura 35:

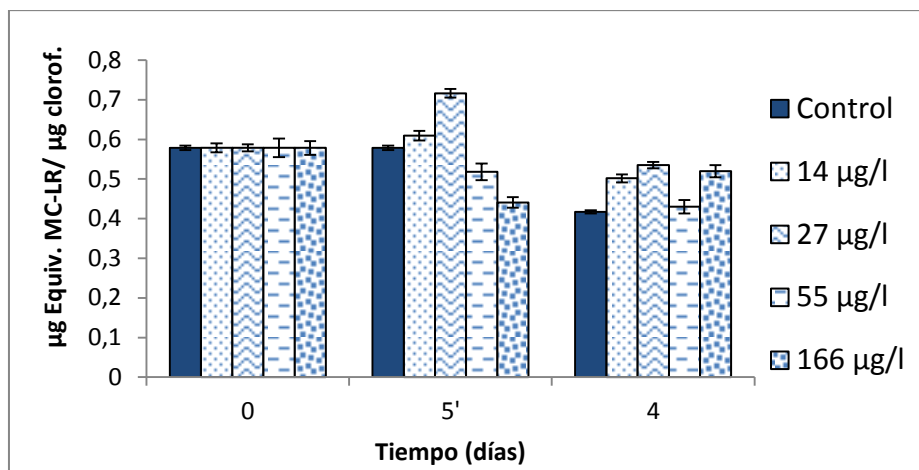


Figura 35. Medida del contenido de microcistina intracelular expresada en µg equivalentes de microcistina-LR por µg de clorofila *a* con respecto al tiempo 0, 5 minutos y 4 días.

Los cultivos con paracetamol muestran, en general, un ligero aumento de microcistina intracelular a los 4 días.

3.4.2.1.3. Ibuprofeno, Atenolol y Voltarén

Para estos tres fármacos se utilizaron concentraciones máximas diez veces superiores a las encontradas en los ríos, con el objetivo de poder determinar claramente su efecto [111]. En el caso del ibuprofeno la concentración utilizada fue de 200 µg/l. Para el atenolol 20 µg/l, y para el voltarén 20 µg/l.

3.4.2.1.3.1. Medida de la cantidad de clorofila *a*

El seguimiento del crecimiento se lleva a cabo mediante medidas de clorofila *a*.

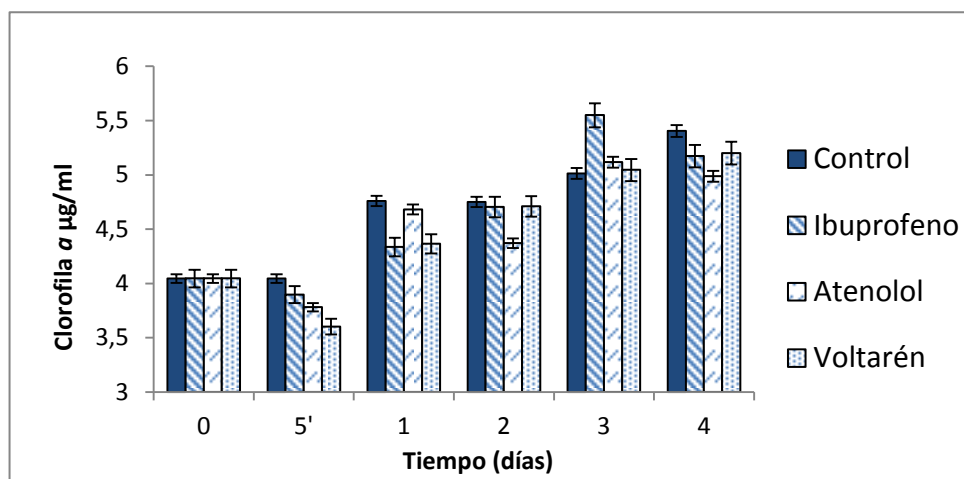


Figura 36. Cantidad de clorofila *a* medida en cada cultivo con respecto al tiempo en días.

No se observan cambios relevantes en el crecimiento.

3.4.2.1.3.2. Medida de la cantidad de microcistina

Se cuantificaron los niveles de microcistina intracelular. El resultado se muestra en la figura 37:

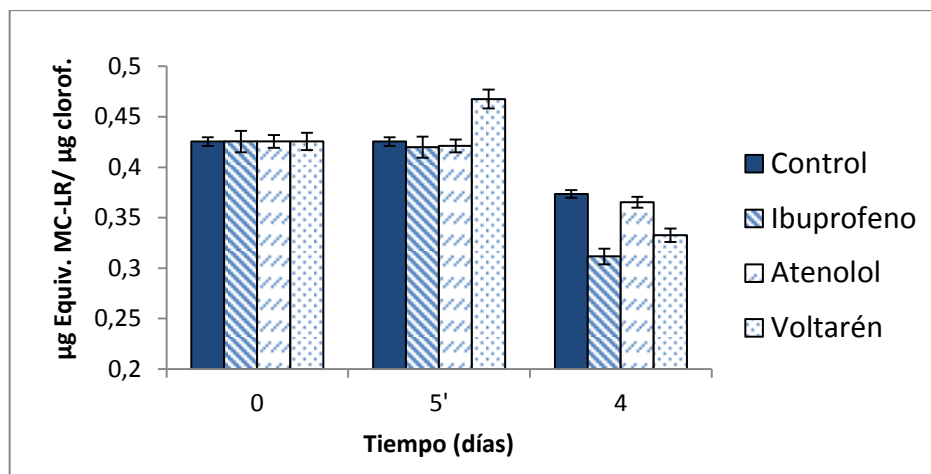


Figura 37. Medida del contenido de microcistina intracelular expresada en μg equivalentes de microcistina-LR por μg de clorofila a con respecto al tiempo en horas.

No se observa un aumento de la síntesis de la toxina para ninguno de los fármacos y la microcistina intracelular puede decirse que, en general, es ligeramente menor en los cultivos con fármacos.

DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

Desde la primera evidencia en 1953, hasta hoy día, se han realizado múltiples estudios que corroboran la toxicidad que presenta el lindano sobre los seres vivos, este hecho ha llevado a la prohibición del pesticida en varios países. Sin embargo, el cierre de las empresas productoras no ha terminado con los problemas originados por estos residuos, vertidos durante años sin ningún tipo de tratamiento ni medida de seguridad.

Las lixiviaciones ocasionadas puntualmente por estos vertederos motivaron en 1988 a prohibir el vertido de las aguas residuales y el depósito de residuos tóxicos y peligrosos procedentes de su fabricación. Hoy en día, siguen apareciendo casos periódicamente y el problema de los suelos contaminados con HCH no parece tener una solución clara por el momento. Es importante destacar que nos hubiera gustado realizar este estudio con todos y cada uno de los isómeros de lindano, subproductos de la producción industrial, pero no fue posible por dos razones. En primer lugar por la duración prevista y las características de dedicación temporal de este proyecto máster, y en segundo lugar, por no disponer comercialmente de ellos, ya que sólo estaban disponibles como estándares para HPLC, algunos de ellos, y pequeñísimas cantidades alcanzaban precios inviables para el grupo. Si este trabajo continúa, es uno de los objetivos previstos.

Este estudio pretende aportar datos que ayuden a poner en claro los efectos ocasionados por estos lixiviados en la población de cianobacterias y en la síntesis de una de las cianotoxinas más abundantes y ubicuas, la microcistina, responsable de la toxicidad de los blooms. El lindano es un compuesto con una baja solubilidad en agua, por lo que se planteó como primer experimento la disolución del pesticida en etanol, al igual que en la literatura se describe para estudios del efecto del lindano en diferentes sistemas biológicos. De esta forma se alcanzaban concentraciones más elevadas de lindano en los cultivos y podía establecerse la curva de tolerancia y el efecto de este compuesto sobre la célula. Dados los efectos que detectamos de los solventes (etanol, dimetilsulfoxido...), decidimos utilizar otra estrategia. En un segundo experimento, se propuso estudiar el efecto del lindano en condiciones más próximas a la situación real de nuestros ríos. Para ello, se llevaron los cultivos a saturación de lindano en agua, lo que suponía una concentración de 7 mg/l.

4.1. Parámetros fisiológicos.

Para llevar a cabo el seguimiento del crecimiento de *M. aeruginosa* PCC 7806 en presencia de lindano, se utilizaron tres procedimientos distintos: medida de la absorbancia del cultivo a 700 nm, medida de la clorofila *a* y conteo del número de células. El método que proporcionó unos resultados más fiables fue la medida de la clorofila *a*, ya que es un parámetro específico de las cianobacterias. El seguimiento mediante la medida de la absorbancia no resultó ser un método adecuado por contribuir la turbidez a la absorbancia. El conteo del número de células es el método más comúnmente utilizado, pero no da cuenta del estado fisiológico de la célula (viva o muerta). Por todo ello, consideramos la medida de la clorofila *a*, el mejor modo de llevar a cabo el seguimiento del crecimiento del cultivo, en este caso. El lindano afecta sin duda a la tasa de crecimiento de las células.

Con los datos de la curva de tolerancia determinamos que la concentración adecuada para llevar a cabo el estudio transcripcional era de 10 mg/l de lindano en etanol, ya que ocasionaba una afectación moderada de las células que nos iba a permitir observar el efecto del pesticida. Las fotografías realizadas mediante microscopía óptica al cultivo control y tras 4 horas de tratamiento con lindano mostraban una grave alteración en la morfología, aunque las células seguían viables según comprobamos en las curvas de crecimiento a largo plazo (datos no mostrados).

Observamos que el etanol estaba afectando por sí mismo a las células y que su efecto se superponía al efecto del lindano en *M. aeruginosa* PCC 7806 ligeramente. Esta interferencia del etanol se tuvo en cuenta posteriormente.

La maquinaria fotosintética es una de las estructuras más afectadas por los diversos estreses, y por esa razón se valoró el cambio experimentado en la composición en carotenoides y ficobiliproteínas. Los carotenoides participan en la defensa frente a la fotooxidación, mientras que las ficobiliproteínas son antena del fotosistema II y reserva nitrogenada, y su presencia se relaciona con la distribución del balance de energía entre ambos fotosistemas. Ambos parámetros estuvieron afectados a las 24 horas. Sin embargo, la producción de radicales libre de oxígeno sólo estaba ligeramente aumentada en las condiciones de estrés por lindano, con respecto a las células control. El descenso que presentan los cultivos con el tiempo en la medida de radicales libres de oxígeno se debe a la adaptación de sus maquinarias fotosintéticas a las condiciones del cultivo, con nuevo régimen de iluminación, al cambiar el autosombreado de las células en la inoculación, que implica dilución.

4.2. Expresión de genes del operon *mcy* y síntesis de microcistina.

Aunque la técnica para valorar los niveles de RNA-m que se escogió es semicuantitativa, para optimizar el resultado, se determinó el número de ciclo en que se encontraba la fase exponencial de amplificación, tanto del gen *rrs* como del *mcyD*. El gen *mcyD* fue seleccionado como gen marcador por ser uno de los miembros del operon *mcy* cuya expresión es indispensable para la síntesis de microcistina. Es el primero en transcribirse en uno de los sentidos del promotor bidireccional y se revela como uno de los responsables de la síntesis del aminoácido Adda, implicado en la toxicidad de la molécula.

El efecto del lindano sobre los niveles de transcrito de *mcyD* indican que hay una cierta inducción, aunque el etanol provoca un descenso. Este aumento del gen marcador nos permite pensar que el lindano puede dar lugar a cianotoxicidad añadida, aunque los niveles de cambio son muy pequeños. El gen *mcyH*, codifica para un transportador ABC, supuestamente implicado en la exportación de la microcistina al exterior celular. No se aprecian grandes cambios en la expresión de este gen ante el tratamiento con lindano. Los altos niveles de microcistina encontrados en el exterior celular de los cultivos que contenían etanol, parecen implicar alguna alteración en la membrana y/o pared causada por el solvente. El gen *mcyJ* se comporta muy diferentemente en los dos tipos de experimentos, con una tendencia a una mayor expresión en presencia de lindano disuelto en etanol y leve en condiciones de saturación en agua cuidado con la flecha.

ntcA experimenta los cambios más acusados de todo el conjunto, viéndose inducido por la presencia de lindano. NtcA afectaría a la expresión de los tres genes *mcy*, y a *furA*. Desconocemos si puede regular al antisentido de *furA*, y a *furB* y *furC*. Al contrario que NtcA, los miembros de la familia Fur mantienen constante su expresión y no parecen verse afectados por la presencia de lindano y/o etanol. Sin embargo, el antisentido de *furA* sí que está aumentado, con lo que se estarían disminuidos los niveles de la proteína.

La microcistina valorada indica que en el interior de las células el etanol en sí mismo ha provocado cierto aumento de la toxina. En presencia de lindano, la microcistina medida mayor que en el control, y supera los niveles cuantificados en el cultivo con etanol a las 24 horas. Cuando el experimento se realiza en ausencia de etanol, se observa el aumento de la microcistina intracelular, prácticamente desde el mismo momento en que la célula se somete a las nuevas condiciones de estrés. Por lo tanto, salvando el efecto ocasionado por el etanol, la presencia de lindano está provocando un pequeño aumento en la síntesis de toxina por la célula.

La microcistina exterior, tanto la potencialmente exportada por *mcyH*, como por la hipotética alteración de las paredes y/o membrana de la cianobacteria, mostró un comportamiento similar, en el caso de la presencia de lindano la cantidad termina siendo a las 24 horas superior al control con y sin etanol.

4.3. Estudios preliminares sobre el efecto de otros contaminantes emergentes.

En estos estudios se realizó un seguimiento del crecimiento de *M. aeruginosa* PCC 7806 en presencia de los distintos contaminantes emergentes y se valoró los niveles de microcistina producida.

En las curvas de crecimiento realizadas para las dos concentraciones de benceno observamos que sólo 100 µg/l del compuesto están afectando ligeramente el crecimiento celular. Se observaron los cultivos al microscopio óptico (fotografías no mostradas) y se vieron ligeros cambios morfológicos, similares a los mostrados para el lindano, aunque más leves, para la concentración más elevada. Del mismo modo, la cantidad de microcistina no parece tender a sufrir cambios.

En el caso del paracetamol, se utilizaron concentraciones crecientes de fármaco de 0-166 µg/l. En ninguna de ellas se observó el crecimiento de la cianobacteria afectado significativamente. Las imágenes obtenidas al microscopio óptico (fotografías no mostradas) no mostraban cambios morfológicos en las células. Los niveles de microcistina intracelular presentan un ligero aumento a los 4 días del tratamiento para todas las concentraciones estudiadas.

En el estudio de los fármacos: ibuprofeno, atenolol y voltarén, tampoco se observa comprometido el crecimiento de *M. aeruginosa* PCC 7806. Los niveles de microcistina intracelular para los cultivos tratados con los distintos fármacos presentaban valores algo inferiores que las células control a los 4 días de la adición.

Parece que las cianobacterias aumentan sus niveles de producción de toxina, en este caso, microcistina, ante situaciones de estrés, posiblemente como mecanismo de defensa.

4.4. Discusión global

Los cambios observados causados por la presencia de lindano han sido en general pequeños y desde nuestro punto de vista, son más relevantes los experimentos realizados en solución acuosa ya que se asemejan más a lo que puede ocurrir en condiciones naturales. Es importante destacar que los cultivos control experimentaron también unos cambios relevantes, debido al fenómeno de acomodación una vez inoculados los cultivos, y en un futuro estudio, pensamos que sería mejor introducir el lindano tras 3 días de cultivo de todas las alicuótas.

El lindano afecta negativamente a la tasa de crecimiento de *M. aeruginosa*, y los efectos en los niveles de los genes del operón *mcy* estudiados pueden valorarse como ligeros aumentos de *mcyD*, tendencia a menor nivel de *mcyH*, y no alteración de *mcyJ*. Aunque es difícil de valorar, hemos elaborado una tabla resumen con esta información (Tabla 5). En cuanto a los reguladores conocidos del operón, NtcA y la familia Fur, claramente puede establecerse que los RNA-m de los miembros de la familia Fur no se ven alterados. Sin embargo, es curioso destacar que sí se ve alterado el nivel de mensajero de un gen antisentido que regula a *furA*, con lo que podríamos esperar que la cantidad de FurA fuera menor. FurA es un represor, y la resultante sería congruente con una mayor expresión del operón *mcy*. El caso de *ntcA* es sin duda el RNA-m que vemos más alterado, con un incremento considerable tras la exposición al lindano. Datos publicados [106] sugieren que NtcA actuaría en este caso como represor, evitando un desvío de nitrógeno a la síntesis de la toxina. Parece haberse originado cierto déficit de nitrógeno, que estaría apoyado por otro dato interesante, que es la disminución de ficobiliproteínas, que suelen ser la primera reserva nitrogenada a la recurren las

cianobacterias. El equilibrio entre Fur y NtcA, además de otros reguladores que en este momento se desconocen, es lo que generará la respuesta global.

Es interesante destacar que el etanol por sí solo, provoca en general una disminución de los mensajeros, excepto en el caso de *ntcA* y *furB* y *furC*, que no se alteran.

Los niveles de microcistina que hemos medido en las células tratadas con lindano son congruentes con lo que observamos en los cambios de RNA-m. En el interior de las células hay un cierto aumento de microcistina, concordante con los pequeños aumentos de los niveles de *mcyD*. La no alteración del transcrito de *mcyH*, un transportador ABC, concuerda con que la microcistina exportada al exterior tenga un comportamiento similar. Se observa una mayor cantidad de microcistina en el medio de cultivo en el caso en que el lindano está disuelto en etanol, pero al no estar inducido *mcyH* (al contrario, hay menor nivel de su mensajero en estos casos) podría relacionarse con alguna alteración de la membrana y/o pared de la cianobacteria.

Los fármacos ensayados, a las concentraciones elegidas, puede decirse en términos generales que no afectan tan apenas al crecimiento de *Microcystis*, y los cambios observados en la producción de microcistina no resultan relevantes. Una situación parecida se plantea con el benceno, en las concentraciones que se encuentran en algunos ríos españoles.

Cultivo a las 24 horas del tratamiento con lindano, con respecto al control								
	<i>mcyD</i>	<i>mcyJ</i>	<i>mcyH</i>	<i>ntcA</i>	<i>furA</i>	<i>α-furA</i>	<i>furB</i>	<i>furC</i>
Lindano	↑	<< ↑	----	↑	n.a	n.a	n.a	n.a
Etanol	↓	↓	↓↓	----	↓	↓	----	----
Lindano+EtOH	↑	↑	↓	↑↑	----	↑	----	----

Tabla 5. Tabla resumen del efecto del lindano sobre los distintos genes estudiados. (n.a: no afecta, por lo que no se ha realizado el estudio).

5. CONCLUSIONES

- 1) En las concentraciones ensayadas, el lindano afecta negativamente al crecimiento de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* PCC 7806.
- 2) El lindano provoca un ligero aumento de los niveles de transcrito del gen *mcyD*, congruentes con un pequeño aumento de producción de microcistina.
- 3) El lindano, por sí mismo, no afecta en líneas generales a la expresión de los genes *mcyH*, y *mcyJ*.
- 4) Los niveles de RNA mensajero de la familia Fur no se ven afectados por la presencia de lindano. Sin embargo, sí se observa un aumento de un RNA antisentido regulador de *furA*.
- 5) La expresión del gen *ntcA*, regulador global del nitrógeno, se observa claramente inducida en presencia de lindano.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Kaebernick, M. and B.A. Neilan, *Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production*. FEMS Microbiol Ecol, 2001. **35**(1): p. 1-9.
2. Francis, G., *Poisonous Australian Lake*. Nature, 1878. **18**((444)): p. 11-12.
3. Luukkainen, R., et al., *Isolation and identification of 12 microcystins from four strains and two bloom samples of Microcystis spp.: structure of a new hepatotoxin*. Toxicon, 1994. **32**(1): p. 133-9.
4. Kusumi, T., Ooi, T., Watanabe, M.M., Takahashi, H., Kakisawa, H., *Cyanoviridin RR, a toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) Microcystis viridis*. Tetrahedron Letters, 1987. **28**: p. 4695-4698.
5. Carmichael, W.W., et al., *Partial structural determination of hepatotoxic peptides from Microcystis aeruginosa (cyanobacterium) collected in ponds of central China*. Toxicon, 1988. **26**(12): p. 1213-7.
6. Harada, K., et al., *Microcystins from Anabaena flos-aquae NRC 525-17*. Chem Res Toxicol, 1991. **4**(5): p. 535-40.
7. Ueno, Y., et al., *Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay*. Carcinogenesis, 1996. **17**(6): p. 1317-21.
8. Sivonen, K., et al., *Three new microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, from Nostoc sp. strain 152*. Chem Res Toxicol, 1992. **5**(4): p. 464-9.
9. Lanaras, T. and C.M. Cook, *Toxin extraction from an Anabaenopsis milleri--dominated bloom*. Sci Total Environ, 1994. **142**(3): p. 163-9.
10. Prinsep, M.R., et al., *Westiellamide, a bistratamide-related cyclic peptide from the blue-green alga Westiellopsis prolifica*. J Nat Prod, 1992. **55**(1): p. 140-2.
11. Neilan, B.A., et al., *Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria*. J Bacteriol, 1999. **181**(13): p. 4089-97.
12. Tonk, L., et al., *Amino acid availability determines the ratio of microcystin variants in the cyanobacterium Planktothrix agardhii*. FEMS Microbiol Ecol, 2008. **65**(3): p. 383-90.
13. Nishiwaki-Matsushima, R., et al., *Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR*. J Cancer Res Clin Oncol, 1992. **118**(6): p. 420-4.
14. MacKintosh, C. and R.W. MacKintosh, *Inhibitors of protein kinases and phosphatases*. Trends Biochem Sci, 1994. **19**(11): p. 444-8.
15. Eriksson, J.E., et al., *Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1025**(1): p. 60-6.
16. Runnegar, M.T., S. Kong, and N. Berndt, *Protein phosphatase inhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystins*. Am J Physiol, 1993. **265**(2 Pt 1): p. G224-30.
17. Moorhead, G., et al., *Purification of type 1 protein (serine/threonine) phosphatases by microcystin-Sepharose affinity chromatography*. FEBS Lett, 1994. **356**(1): p. 46-50.
18. Fujiki, H., Suganuma, M., *Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters*. J Cancer Res Clin Oncol, 1999. **125**: p. 150-155.
19. Zhou, L., Yu, H., Chen, K., *Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer*. Biomed Environ Sci 2002. **15**: p. 166-171.
20. Goldberg, J., Huang, H.B., Kwon, Y.G., Greengard, P., Nairn, A.C., Kuriyan, J., *Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1*. Nature, 1995. **376**: p. 745-753.
21. MacKintosh, R.W., et al., *The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1*. FEBS Lett, 1995. **371**(3): p. 236-40.
22. Shi, L., W. W. Carmichael I. Miller, *Immuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells*. Arch Microbiol 1995. **163**: p. 7-15.
23. Young, F.M., Thomson, C., Metcalf, J.S., Lucocq, J.M., Codd, G.A., *Immunogold localisation of microcystins in cryosectioned cells of Microcystis*. J Struct Biol, 2005. **151**: p. 208-14.
24. Dittmann, E., et al., *Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium Microcystis aeruginosa PCC 7806*. Mol Microbiol, 1997. **26**(4): p. 779-87.
25. Nishizawa, T., et al., *Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in Microcystis spp.* J Biochem, 1999. **126**(3): p. 520-9.
26. Tillett, D., et al., *Structural organization of microcystin biosynthesis in Microcystis aeruginosa PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system*. Chem Biol, 2000. **7**(10): p. 753-64.
27. Nishizawa, T., et al., *Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin*. J Biochem, 2000. **127**(5): p. 779-89.
28. Rouhiainen, L., et al., *Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium Anabaena strain 90*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(2): p. 686-92.
29. Christiansen, G., et al., *Microcystin biosynthesis in planktothrix: genes, evolution, and manipulation*. J Bacteriol, 2003. **185**(2): p. 564-72.
30. Neilan B. A, P.L.A., Moffitt M. C, Mihali K. T, Kaebernick M, Kellmann R, Pomati F, ed. *The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity*. ed. S.p.B.a.B.S. Cyanobacteria and Astrobiology Research Laboratory, The University of New South Wales: Sydney, NSW, Australia.

31. Nishizawa, T., M. Asayama, and M. Shirai, *Cyclic heptapeptide microcystin biosynthesis requires the glutamate racemase gene*. Microbiology, 2001. **147**(Pt 5): p. 1235-41.
32. Sielaff, H., et al., *The mcyF gene of the microcystin biosynthetic gene cluster from Microcystis aeruginosa encodes an aspartate racemase*. Biochem J, 2003. **373**(Pt 3): p. 909-16.
33. Stewart, W.D., *Some aspects of structure and function in N₂-fixing cyanobacteria*. Annu Rev Microbiol, 1980. **34**: p. 497-536.
34. Frias, J.E., E. Flores, and A. Herrero, *Requirement of the regulatory protein NtcA for the expression of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120*. Mol Microbiol, 1994. **14**(4): p. 823-32.
35. Herrero, A., A.M. Muro-Pastor, and E. Flores, *Nitrogen control in cyanobacteria*. J. Bacteriol., 2001. **183**: p. 411-425.
36. Martin-Luna, B., et al., *Identification of a Ferric uptake regulator from Microcystis aeruginosa PCC7806*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **254**(1): p. 63-70.
37. Martin-Luna, B., et al., *Fur from Microcystis aeruginosa binds in vitro promoter regions of the microcystin biosynthesis gene cluster*. Phytochemistry, 2006. **67**(9): p. 876-81.
38. Martin-Luna, B., et al., *Expression of fur and its antisense alpha-fur from Microcystis aeruginosa PCC7806 as response to light and oxidative stress*. J Plant Physiol, 2011. **168**(18): p. 2244-50.
39. Hantke, K., *Iron and metal regulation in bacteria*. Curr Opin Microbiol, 2001. **4**(2): p. 172-7.
40. Bsai, N., et al., *Bacillus subtilis contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors*. Mol Microbiol, 1998. **29**(1): p. 189-98.
41. Patzer, S.I. and K. Hantke, *The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1998. **28**(6): p. 1199-210.
42. Diaz-Mireles, E., et al., *The Fur-like protein Mur of Rhizobium leguminosarum is a Mn(2+)-responsive transcriptional regulator*. Microbiology, 2004. **150**(Pt 5): p. 1447-56.
43. Ahn, B.E., et al., *Nur, a nickel-responsive regulator of the Fur family, regulates superoxide dismutases and nickel transport in Streptomyces coelicolor*. Mol Microbiol, 2006. **59**(6): p. 1848-58.
44. Crosa, J.H., *Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria*. Microbiol Rev, 1989. **53**(4): p. 517-30.
45. Hernandez, J.A., et al., *Three fur homologues from Anabaena sp. PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition*. FEMS Microbiol Lett, 2004. **236**(2): p. 275-82.
46. Jungblut, A.D., et al., *Characterization of microcystin production in an Antarctic cyanobacterial mat community*. Toxicon, 2006. **47**(3): p. 271-8.
47. Harding, W.R., et al., *Death of a dog attributed to the cyanobacterial (blue-green algal) hepatotoxin nodularin in South Africa*. J S Afr Vet Assoc, 1995. **66**(4): p. 256-9.
48. Zambrano, F. and E. Canelo, *Effects of microcystin-LR on the partial reactions of the Na(+)-K⁺ pump of the gill of carp (Cyprinus carpio Linneo)*. Toxicon, 1996. **34**(4): p. 451-8.
49. Soll, M.D. and M.C. Williams, *Mortality of a white rhinoceros (Ceratotherium simum) suspected to be associated with the blue-green alga Microcystis aeruginosa*. J S Afr Vet Assoc, 1985. **56**(1): p. 49-51.
50. Carmichael, W.W., *The toxins of cyanobacteria*. Sci Am, 1994. **270**(1): p. 78-86.
51. Matsunaga, H., et al., *Possible cause of unnatural mass death of wild birds in a pond in Nishinomiya, Japan: sudden appearance of toxic cyanobacteria*. Nat Toxins, 1999. **7**(2): p. 81-4.
52. Hoeger, S.J., et al., *Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in two Australian drinking water treatment plants*. Toxicon, 2004. **43**(6): p. 639-49.
53. Teixeira, C.F., et al., *[The political and administrative context of the implementation of Health Districts in the State of Bahia, Brazil]*. Cad Saude Publica, 1993. **9**(1): p. 79-84.
54. Annadotter, H., *Cyanobacterial toxins in drinking water - a study of two Swedish water plants and a literary study* VA-Forsks Rapportserie. (Haessleholms Gatukontor (Sweden)), 1993.
55. Pereira, P., et al., *Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium Aphanizomenon flos-aquae, isolated from Montargil reservoir, Portugal*. Toxicon, 2000. **38**(12): p. 1689-702.
56. Hindman, S.H., et al., *Pyrogenic reactions during haemodialysis caused by extramural endotoxin*. Lancet, 1975. **2**(7938): p. 732-4.
57. Pouria, S., et al., *Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil*. Lancet, 1998. **352**(9121): p. 21-6.
58. Azevedo, S.M., et al., *Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil*. Toxicology, 2002. **181-182**: p. 441-6.
59. Carmichael, W.W., et al., *Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins*. Environ Health Perspect, 2001. **109**(7): p. 663-8.
60. Ito, E., F. Kondo, K. Terao, K. Harad, *Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR*. Toxicon, 1997. **35**: p. 1453-7.
61. Tang, Z.Y., Wu, M.C., Xia, S.S., *Primary liver cancer*, Springer-Verlag, Editor. 1989, Berlin: China Academic Publishers.
62. Hunter, P.R., *Cyanobacterial toxins and human health*. Symp Ser Soc Appl Microbiol 1998. **27**: p. 35S-40S.
63. Yu, S., Zhao, N., Zi, X., *[The relationship between cyanotoxin (microcystin, MC) in pond-ditch water and primary liver cancer in China]*. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 2001. **23**: p. 96-99.

64. Welker, M., von Dohren, H., Tauscher, H., Steinberg, C.E.W., Erhard, M., *Toxic Microcystis in shallow Lake Muggelsee (Germany) dynamics, distribution, diversity*. Arch Hydrobiol, 2003. **157**: p. 227-248.
65. Fastner, J., M. Erhard, and H. von Dohren, *Determination of oligopeptide diversity within a natural population of Microcystis spp. (cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(11): p. 5069-76.
66. CEDEX, *Cianobacterias en los embalses españoles*, C.d.E. Hidrográficos, Editor, Hoyos Alonso.
67. Vidal-Celma, A., *Evolution d'un lac de barrage dans le NE de l'Espagne pendant les quatre premières années de service*. Verh. Internat. Verein. Limnol., 1969. **17**: p. 191-200.
68. Planas, D., *Distribution and productivity of the phytoplankton in Spanish reservoirs*. Verh. Internat. Verein. Limnol., 1975. **19**: p. 1860-1870.
69. Sabater, S., J. Nolla, *Distributional patterns of phytoplankton in Spanish reservoirs: First results and comparison after fifteen years*. Verh. Internat. Verein. Limnol., 1991. **24**: p. 1371-1375.
70. De Hoyos, C., A. Negro, J.J. Aldasoro, *Cyanobacteria distribution and abundance in the Spanish water reservoirs during thermal stratification*. Limnetica, 2004. **23**((1-2)): p. 119-132.
71. Diersing, N., *Phytoplankton Blooms: The Basics*. in *In Florida Keys National Marine Sanctuary*. 2009.
72. Margalef, R., M. D. Planas, J. Armengol, A. Vidal, N. Prat, A. Guisset, J. Toja, M. Estrada, *Limnología de los embalses españoles*, in *M.O.P. Publ. 123*, D.G.d.O. Hidráulicas, Editor. 1976: Madrid.
73. Costas E., L.-r.V., *Cianobacterias tóxicas y mortandades masivas en el parque nacional de doñana: red de alerta temprana y estrategias de gestión*. Proyectos de investigación parques nacionales, 2003-2006.
74. Moreno I. M., P.P., Franca S., Cameán A., *Toxic cyanobacteria strains isolated from blooms in the Guadiana River (southwestern Spain)*. Biol Res, 2004. **37**: p. 405-417.
75. Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Pamela A. Matson, Schindler, D.W., William H. Schlesinger, Tilman, D.G., *Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences*. Ecological Applications, 1997. **7**: p. 737-750.
76. Petrovic, M., et al., *Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: a survey on new monitoring strategies and occurrence data*. Anal Bioanal Chem, 2004. **378**(3): p. 549-62.
77. Solomon, L.M., L. Fahrner, and D.P. West, *Gamma benzene hexachloride toxicity: a review*. Arch Dermatol, 1977. **113**(3): p. 353-7.
78. IARC, ed. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Man: Some Organochlorine Pesticides*, ed. I.A.f.R.o. Cancer. Vol. 5. 1973: Lyon. 47-73.
79. Sang S, P.S., Cuddeford V., ed. *Lindane. A review of toxicity and enviromental fate*. World Wildlife Fund. 1999: Canada.
80. Hardie, D.W.F., ed. *Benzene hexachloride*. 2nd edition ed. Encyclopedia of Chemical Technology, ed. R.E.a.O. Kirk, D.F. Vol. 5. 1964: New York: John Wiley & Sons. 267-281.
81. Danopoulos, E., K. Melissinos, and G. Katsas, *Serious poisoning by hexachlorocyclohexane; clinical and laboratory observations on five cases*. AMA Arch Ind Hyg Occup Med, 1953. **8**(6): p. 582-7.
82. Sumpter, J.P., *Reproductive effects from oestrogen activity in polluted water*. Arch Toxicol Suppl, 1998. **20**: p. 143-50.
83. ATSDR., *Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Minimal Risk Levels (MRLs) for Hazardous Substances*. Internet Site <http://atsdr1.atsdr.cdc.gov:8080/mrls.html>, 1997a. **Accessed 23/09/98**.
84. ATSDR., *Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Substance Information. GAMMAHEXACHLOROCYCLOHEXANE*. Internet Site <http://atsdr1.atsdr.cdc.gov:8080/gsq/>, 1997b. **Accessed 23/09/98**.
85. Nolan B. A, K.M.D., Levitt M. D, *Lindane toxicity: a comprehensive review of the medical literature*. Pediatric Dermatology, 2012. **29**(2): p. 141-146.
86. quality, B.d.f.d.o.W.G.f.d.-w., *Lindane in drinking-water*. WHO/SDE/WSH/03.04/102.
87. Woollorton, E., *Concerns over lindane treatment for scabies and lice*. CMAJ, 2003. **168**(11): p. 1447-8.
88. Jones, O.A., N. Voulvoulis, and J.N. Lester, *Human pharmaceuticals in the aquatic environment a review*. Environ Technol, 2001. **22**(12): p. 1383-94.
89. Hernando, M.D., et al., *Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments*. Talanta, 2006. **69**(2): p. 334-42.
90. Petrovic, M., et al., *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review*. J Chromatogr A, 2005. **1067**(1-2): p. 1-14.
91. Qian H, P.X., Chen J, Zhou D, Chen Z, Zhang L, Fu Z., *Analyses of gene expression and physiological changes in Microcystis aeruginosa reveal the phytotoxicities of three enviromental pollutants*. Ecotoxicology, 2012. **21**: p. 847-859.
92. Fent, K., A.A. Weston, and D. Caminada, *Ecotoxicology of human pharmaceuticals*. Aquat Toxicol, 2006. **76**(2): p. 122-59.
93. Gros, M., M. Petrovic, and D. Barcelo, *Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the ebro river basin (northeast Spain)*. Environ Toxicol Chem, 2007. **26**(8): p. 1553-62.
94. Taylor, R.F. and B.H. Davies, *Triterpenoid carotenoids and related lipids. Triterpenoid carotenoid aldehydes from Streptococcus faecium UNH 564P*. Biochem J, 1976. **153**(2): p. 233-9.

95. Glazer, A.N., et al., *Biliproteins of cyanobacteria and Rhodophyta: Homologous family of photosynthetic accessory pigments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(2): p. 428-31.
96. Thurman, R.G., H.G. Ley, and R. Scholz, *Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase*. Eur J Biochem, 1972. **25**(3): p. 420-30.
97. Molin, M., et al., *Ionizing radiation induces a Yap1-dependent peroxide stress response in yeast*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(1): p. 136-44.
98. Gonzalez, A., et al., *Overexpression of FurA in Anabaena sp. PCC 7120 reveals new targets for this regulator involved in photosynthesis, iron uptake and cellular morphology*. Plant Cell Physiol, 2010. **51**(11): p. 1900-14.
99. Sevilla, E., et al., *Optimization of intracellular microcystin-LR extraction for its analysis by protein phosphatase inhibition assay*. Water Sci Technol, 2009. **60**(7): p. 1903-9.
100. Sevilla, E., ed. *Estudio de factores que inciden en la síntesis de microcistina en Microcystis aeruginosa PCC7806 y diseño de un kit para su cuantificación*. Bioquímica y Biología Molecular y Celular Zaragoza: Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza. 2007.
101. Siebert, P.D., ed. *Quantitative RT-PCR*. Humana Press, ed. B.K. Protocols, U. Reischl. 1999: New Jersey. 61-85.
102. Breljak, D., Ambriović-Ristov, A., Kapitanovic, S., Cacev, T., Gabrilovac, J., *Comparison of three RT-PCR based methods for relative quantification of mRNA*. Food Technol. Biotechnol., 2005. **43**(4): p. 379-88.
103. Thellin, O., et al., *Housekeeping genes as internal standards: use and limits*. J Biotechnol, 1999. **75**(2-3): p. 291-5.
104. Siebert, P.D., *Quantitative rt-PCR*. Methods Mol Med, 1999. **26**: p. 61-85.
105. Sevilla, E., et al., *Iron availability affects mcyD expression and microcystin-LR synthesis in Microcystis aeruginosa PCC7806*. Environ Microbiol, 2008. **10**(10): p. 2476-83.
106. Kuniyoshi, T.M., et al., *2-oxoglutarate enhances NtcA binding activity to promoter regions of the microcystin synthesis gene cluster*. FEBS Lett, 2011. **585**(24): p. 3921-6.
107. Stainer RY, C.-B.G., *Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria*. Annual Review of Microbiology, 1977. **31**: p. 225-274.
108. W., W., *Phycobilisomes: Structure and Function*, in *Experimental Phycology: Cell Walls and Surfaces, Reproduction, Photosynthesis*, R.D.a.S.R. Wiesser W, Editor. 1990, Springer Verlag, Heidelberg. p. 158-172.
109. Figueroa, F.L., et al., *Biofiltration of fishpond effluents and accumulation of N-compounds (phycobiliproteins and mycosporine-like amino acids) versus C-compounds (polysaccharides) in Hydropuntia cornea (Rhodophyta)*. Mar Pollut Bull, 2012. **64**(2): p. 310-8.
110. Barceló L. D., I.d.A.M.J., *Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes*, Panel Científico-Técnico de Seguimiento de la Política de Aguas: Convenio Universidad de Sevilla-Ministerio de Medio Ambiente.
111. Gros, M., M. Petrovic, and B.L. D., *Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching*. Anal. Chem., 2009. **81**: p. 898-912.