



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Estudio del perfil metabólico y la presencia de genes
lin en comunidades microbianas de suelos
contaminados por lindano

*Metabolic profile and lin gene presence study on
microbial populations from lindane contaminated soils*

Victoria Puértolas García

Director/es

Enrique Navarro Rodríguez

Instituto Pirenaico de Ecología (IPE), Centro Superior de Investigaciones Científicas
(CSIC)

Emma Sevilla Miguel

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Zaragoza

Ponente

María Luisa Peleato Sánchez

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Zaragoza

CURSO 2018/2019

ABREVIATURAS

HCH: Hexaclorociclohexano

IPE: Instituto Pirenaico de Ecología

CSIC: Centro Superior de Investigaciones Científicas

UV: Ultravioleta

COP: Contaminantes Orgánicos Persistentes

INQUINOSA: Industrias Químicas del Noroeste S.A.

DNAPL: Líquido de fase densa no acuosa

1,3,4,6-TCDN: 1,3,4,6-tetracloro-1,4-ciclohexadieno

γ -PCCH: γ -pentaclorociclohexano

2,5-DDOL: 2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol

2,5- DCHQ: 2,5-diclorohidroquinona

HQ: hidroquinona

γ -HMSA: hidroximuconicosemialdehído

MA: maleilacetato

CLPP: Perfil Fisiológico a nivel de comunidad

AMRs: Respuesta Metabólica Media

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1 El problema del lindano	2
2.2 La microbiología del suelo	3
2.3 Ruta degradadora del lindano en bacterias aerobias de suelo	4
2.4 Genes <i>lin</i>	5
3 OBJETIVOS	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS	6
4.1 Muestras utilizadas en el estudio	6
4.1.1 Muestreo de materiales frescos	7
4.2 Enriquecimiento de poblaciones bacterianas en tierras contaminadas	7
4.3 Protocolo Ecoplates BIOLOG®	8
4.3.1 Extracción bacteriana	8
4.3.3 Análisis estadístico	8
4.4 Puesta a punto de extracción de DNA a partir de muestras de suelos	9
4.4.1 Técnica fenol-cloroformo con digestión mecánica (<i>Protocolo 1</i>)	9
4.4.2 Kit comercial (<i>Protocolo 2</i>)	9
4.4.3 Técnica fenol-cloroformo con digestión enzimática (<i>Protocolo 3</i>)	10
4.4.4 Cuantificación del DNA	10
4.5 Ensayos de PCR	10
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
5.1 Estudio del perfil metabólico con BiologEcoplates®	11
5.1.1 Análisis de la respuesta metabólica media (AMRs)	11
5.1.2 Análisis de la utilización de carbohidratos	13
5.2 Puesta a punto de extracción de DNA a partir de muestras de suelos	16
5.3 Búsqueda de genes <i>lin</i> como potenciales marcadores de la presencia de bacterias degradadoras de lindano	18
5.4 Análisis de la presencia de genes <i>lin</i> en las muestras de suelo contaminadas por lindano mediante PCRs	19
5.4.1 Análisis en muestras ultracongeladas	19
5.4.2 Análisis en muestras enriquecidas	19
5.4.3 Estudio de la presencia de genes <i>lin</i> en muestras frescas	20
6. DISCUSIÓN GLOBAL	22
7. CONCLUSIONES	23
8. BIBLIOGRAFÍA	24

1. RESUMEN

El lindano es el isómero γ del hexaclorociclohexano (HCH), producto de su fabricación de mediante la fotoclорación del benceno, proceso en el que se generan cuatro isómeros más (α -HCH, β -HCH, δ -HCH, y ϵ -HCH). El elevado uso del Lindano como pesticida de uso agrícola durante las últimas 6 décadas ha generado graves problemas medioambientales derivados de su toxicidad y permanencia en el medio ambiente. Concretamente, en la localidad de Sabiñánigo (Huesca), las actividades de INQUINOSA, fábrica productora de este pesticida, provocaron la acumulación desregulada de desechos de fabricación del HCH en diferentes zonas de la periferia de la localidad: verteros de Sardas, Bailín, y las propias inmediaciones de la fábrica. Estudios realizados por el Instituto Pirenaico de Ecología (IPE-CSIC) revelaron la capacidad de las poblaciones microbianas en tierras localizadas en estos emplazamientos contaminados con lindano, de tolerar e incluso degradar isómeros del HCH, mayoritariamente el γ -HCH. Dichas tierras, fueron proporcionadas para este estudio, con el objetivo de caracterizar las poblaciones metabólicamente y buscar en ellas genes, mediante el diseño de oligos para la técnica de PCR, correspondientes a la ruta de degradación *lin* descrita en *Sphingomonaceas* y otros géneros bacterianos comunes de suelos.

Los resultados muestran que las poblaciones muestreadas han permanecido metabólicamente activas. Sin embargo, no se han encontrado dichos genes correspondientes a la ruta estudiada, indicativo de que o bien los microorganismos modelo para el diseño de los oligos no están presentes en estas tierras, los genes *lin* buscados no presentan homología con los estudiados o las poblaciones bacterianas de estos suelos degradan por una ruta diferente a la *lin* descrita.

1. ABSTRACT

Lindane is the γ isomer of hexachlorineciclohexane (HCH), product of its fabrication through benzene photochloration, a process that generates four more isomers (α -HCH, β -HCH, δ -HCH, y ϵ -HCH). The high use of lindane as an agricultural pesticide during the last 6 decades has generated serious environmental problems, because of its toxicity and permanence in the environment. Precisely, in the location of Sabiñánigo (Huesca), activities performed by INQUINOSA, lindane producer factory, caused a deregulated accumulation of toxic HCH waste in different suburbs of the locality: Sardas and Bailín landfills, and the proximities of the factory. Studies performed by the Pyrenean Institute of Ecology (IPE) revealed the capacity of tolerating and even degrading HCH isomers, mostly γ -HCH, by microbial populations in soils from those locations. Those soils were given to make this study, with the objective of metabolically characterizing microbial populations and searching for *Sphingomonaceous* and other soil bacteria genres, *lin* degradation pathway genes, by primers design for PCR analysis.

The results show that sampled populations have remained metabolically active. However, studied genes for *lin* degradation pathway have not been found, which indicates that either soil microorganisms used for the design of the primers are not present in the samples, *lin* genes are not homologous with the ones that were studied, or microbial populations in those soils are degrading lindane though a different pathway than the *lin* described in this paper.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 El problema del lindano

El lindano, isómero comercial del hexaclorociclohexano (HCH), es un compuesto químico ampliamente utilizado a escala global para la producción de pesticidas y biocidas. Se obtiene mediante la cloración fotoquímica del benceno, donde el Cl_2 sufre una rotura homolítica por la aplicación de radiación UV, creando radicales Cl^\cdot que se adicionan a la molécula de benceno.⁽¹⁾ Este proceso genera una mezcla de isómeros del HCH, el HCH técnico. Para purificar de ellos el isómero γ -HCH, se empleaban procesos ineficientes en los que por cada tonelada producida de lindano, se generaban entre 8-12 t de isómeros HCH residuales: (α -HCH, 55–80 %; β -HCH, 5–14 %; δ -HCH, 2–16 %; y ϵ -HCH, 3–5 %)⁽¹⁾(Figura 1).

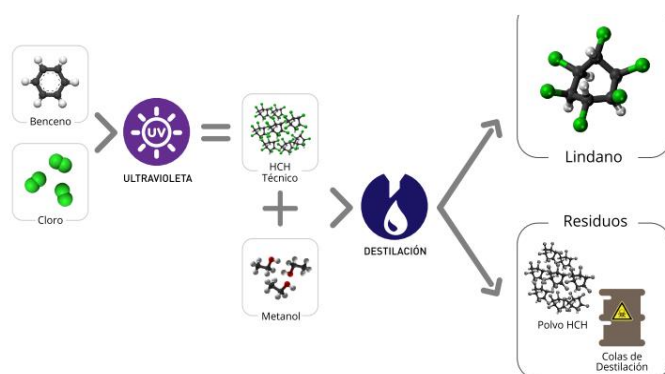


Figura 1. Esquema del proceso productivo del lindano.⁽¹⁾

El uso de tanto del lindano como del HCH técnico durante las últimas 6 décadas ha generado un problema medioambiental a escala global. Su uso global para agricultura entre 1950 y 2000s se estima en unas 450,000 t⁽²⁾. La producción más elevada se dio entre los años 60-70, y su uso se ha tenido que prohibir ya en al menos 52 países, debido a sus efectos nocivos.

En cualquier caso, el problema medioambiental más grave no sería el uso del lindano, sino los vertederos que contienen el 85% de la producción, constituido por los isómeros. En 2009, los isómeros del hexaclorociclohexano (HCH) α -HCH, β -HCH y γ -HCH se listaron como contaminantes orgánicos persistentes (COP) en la Convención de Estocolmo⁽²⁾. Estos contaminantes se caracterizan por ser muy perjudiciales en el medio ambiente: resisten a la degradación, son muy volátiles y bioacumulables tanto en medio como en los tejidos de los seres vivos, y son altamente tóxicos provocando alteraciones tanto en la salud humana como en la cadena trófica de los ecosistemas⁽³⁾. Precisamente el lindano fue el que se comercializó, por ser el isómero más biodegradable y con mejores propiedades insecticidas.

En España, la producción de lindano se concentró en 4 fábricas: dos en el País Vasco, una en Galicia y la cuarta en la provincia de Huesca. La antigua fábrica de INQUINOSA (Industrias Químicas de Noroeste S.A.), situada en Sabiñánigo, realizó su actividad entre los años 1975-1988, y continuó formulando productos de lindano hasta 1992, con el cese definitivo de su actividad y abandono del edificio. En este tiempo, se estima que se llegaron a generar 7000 t de residuos sólidos y 300-500 t de residuos líquidos. La mayor parte de los residuos sólidos se compone de los isómeros α , β , δ y ϵ -HCH, además de los lodos de depuración, embalajes, excedentes de lindano (γ -HCH). Los residuos líquidos se componen principalmente de las colas de destilación y restos de reacciones fallidas^(1,3).

Sin ninguna regulación medioambiental ni protocolos de tratamiento de residuos, éstos fueron acumulados en zonas no aseguradas del vertedero de Sardas, el barranco de Bailín, y las propias inmediaciones de la fábrica de INQUINOSA. La proximidad de estos emplazamientos a fuentes de agua como el río Gállego, el embalse de Sabiñánigo, junto con la aparición en los vertederos de una fase libre densa o DNAPL, formada por los residuos líquidos mal acumulados, han elevado la situación a un problema medioambiental de categoría grave. La fase líquida no acuosa densa (DNAPL) tiende a descender hacia zonas impermeables, y dada su densidad, a migrar hacia el medio subterráneo, acuíferos hasta la propia roca madre. Además de altamente persistente, su densidad impide la propia descontaminación por técnicas de bombeo.⁽³⁾

Esto supone la búsqueda y modernización de las técnicas de tratamiento, que no solo tienen que abarcar a los residuos sólidos emplazados ahora, en las nuevas células de seguridad construidas, sino que tienen que hacer frente también a un problema en las tierras superficiales de los antiguos vertederos. Es aquí donde estrategias biotecnológicas como la biorremediación, van a empezar a adquirir importancia.

2.2 La microbiología del suelo

El suelo superficial (0-20 cm) es donde ocurren la mayoría los procesos microbianos, debido a la disposición de restos orgánicos y O₂ en él. Encontramos en estas primeras capas la mayor cantidad de organismos con metabolismos aeróbicos, mientras que, a profundidades mayores, los microorganismos aerobios tolerantes y los anaerobios son los dominantes, degradando compuestos derivados de la actividad de los microorganismos de las capas superficiales.⁽⁴⁾

La distribución de los microorganismos en el suelo es muy heterogénea. Es común la formación de comunidades microbianas, en forma de biofilms, donde las poblaciones interactúan entre sí y con el medio ambiente. Dentro del suelo, también se dan asociaciones estructurales, denominadas agregados, en las que están inmersas partículas minerales, ligadas por compuestos orgánicos, y los organismos vivos o fracción biótica.⁽⁴⁾

La elevada diversidad taxonómica presente en ecosistemas de suelo proporciona una oportunidad evolutiva de adaptación a diferentes condiciones cambiantes del ecosistema, como la aparición de contaminaciones. Concretamente, en regiones altamente contaminadas por organoclorados, se comenzaron a observar diferentes niveles de degradación bajo condiciones anaerobias, generalmente llevadas a cabo por bacterias del género *Clostridium*⁽⁵⁾, y aerobias, la mayoría conocidas hasta la fecha miembros de la familia *Sphingomonadaceae*⁽⁶⁾ (*Sphingomonas* y *Sphingobium*). Por el momento se han descrito alrededor del mundo unas 30 *Sphingomonaceas* degradadoras⁽⁵⁾, pero también se ha registrado actividad degradadora por parte de géneros como *Pseudomonas*^(9,10), *Rhodanobacter*⁽⁶⁾ y *Microbacterium*⁽⁷⁾ entre otros.

Sphingomonas es un género conocido por ser característico de suelos, pero se aísla tanto de tierra como de ambientes acuáticos⁽⁸⁾. *Sphingobium* se engloba dentro de la familia taxonómica de las *Sphingonadaceae*, al igual que las *Sphingomonas*. Pertenecen al filo *Proteobacterias*, y se caracterizan por ser bacilos quimio heterótrofos. La cepa tipo establecida en el estudio de degradación de hexaclorociclohexanos es *Sphingomonas paucimobilis* UT26⁽⁹⁾ también denominada *Sphingobium japonicum* UT26.

Pseudomonas, pertenecientes al filo *Proteobacteria*, son bacilos de hábitat ubicuo. Forman parte del microbiota predominante en la rizosfera y filosfera de plantas, y han sido aisladas de

suelos tanto limpios como contaminados. Son también inocuas para el hombre, siendo algunas cepas patógenas oportunistas. En general están caracterizadas por una gran adaptación al medio ambiente. La cepa tipo es *Pseudomonas aeruginosa*, la cual ha sido descrita por su actividad degradadora de muchos compuestos orgánicos⁽¹⁰⁾.

Estos dos géneros han sido los más caracterizados en cuanto a la ruta degradadora del HCH. Sin embargo, es posible que algunos microorganismos que tienen papeles importantes en la degradación del HCH en el suelo de cultivos mixtos no puedan crecer en las condiciones en las que se han estudiado estas cepas tipo ⁽⁶⁾.

2.3 Ruta degradadora del lindano en bacterias aerobias de suelo

Numerosos estudios respaldan la degradación de 4 isómeros del HCH en condiciones aerobias, $\alpha, \delta, \beta, \gamma$ -HCH. Como ha sido mencionado anteriormente, la mayoría perteneciente a las Sphingomonaceas, centrándose las investigaciones en las 3 de las 30 mayores cepas: *Sphingobium japonicum* UT26 (*S. paucimobilis*), *Sphingobium indicum* B90 y *Sphingobium francense* Sp+. Aunque todas las cepas degradan HCH, encontramos diferencias específicas a cada isómero en los primeros pasos de la ruta de degradación. UT26 ha sido estudiada con detalle en cuanto a la ruta degradadora del γ -HCH⁽⁵⁾, el isómero más biodegradable de todos. Generalmente se han distinguido en este proceso dos partes: [Anexo 9.1]

La ruta “upstream”: comienza con dos dehidroclorinaciones sucesivas catalizadas por la proteína LinA (dehidroclorinasa) produciendo 1,3,4,6-tetracloro-1,4-ciclohexadieno (1,3,4,6-TCDN), vía el intermediario γ -pentaclorociclohexano (γ -PCCH). Después, la proteína LinB (haloalcanodehalogenasa) cataliza dos declorinaciones hidrolíticas sucesivas, dando lugar a 2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol (2,5-DDOL). Por último, se forma una 2,5-diclorohidroquinona (2,5- DCHQ) mediante una deshidrogenación, catalizada por LinC (Deshidrogenasa), completando esta vía superior de degradación.

La ruta “downstream”: El primer paso es una declorinación reductiva del 2,5-DCHQ a cloroquinona (CHQ). La ruta entonces se bifurca, con una ruta menor compuesta por otra declorinación reductiva para producir hidroquinona (HQ), cuyo anillo es escindido a ácido γ -hidroximuconicosemialdehído (γ -HMSA) tras la actuación de las proteínas LinD (declorinasa reductiva) y LinE (oxigenasa). La ruta mayor consiste en la transformación del CHQ a cloruro de acilo catalizada por LinE. Posteriormente es transformado a maleilacetato (MA) y a β -cetoadipato por la acción de las enzima LinF (reducataasa). Para terminar, se da la formación de succinyl-CoA, y acetyl-CoA tras la actuación de LinG-H (transferasas) y LinJ (tiolasa), que serán metabolizados por la bacteria mediante el ciclo de Krebs.

Además de estas enzimas, se ha descrito un regulador transcripcional, LinR, inductor de la expresión de algunos genes de la ruta por la presencia de sus sustratos ⁽¹¹⁾.

Los demás isómeros no son degradados hasta su totalidad, sino que la mayoría se mineralizan a otros compuestos: el isómero α -HCH se convierte en 2,3,5,6-tetraclorociclohexanodiol (2,3,5,6-TCDL) mediante sucesivas reacciones de declorinación, pero no llega a ser mineralizado por completo hasta CO₂ y H₂O. El β -HCH es el isómero más recalcitrante de todos, debido a su estructura molecular: un isómero ecuatorialmente sustituido, que impide que las reacciones de declorinación hidrolítica se lleven a cabo. Se ha documentado su degradación hasta 2,3,4,5,6-

pentaclorociclohexanol (PCHL). Y, por último, para δ -HCH se han propuesto dos rutas: parcialmente siguiendo pasos de la ruta de γ -HCH; o de una manera similar a β -HCH⁽⁵⁾.

2.4 Genes *lin*

Los genes catabólicos asociados a la degradación del lindano fueron inicialmente descritos en *S. japonicum* UT26, y nombrados genes *lin*. Seis genes estructurales (*linA*-*linF*) y un gen regulador (*linR*) catalizan para los enzimas que se encargan de la completa mineralización del γ -HCH, mediante la ruta descrita en el apartado anterior. Además, encontramos el gen *linX*, que codifica para una proteína que tiene actividad similar a *linC*⁽¹²⁾.

Los pasos más importantes en la degradación son las reacciones iniciales de dechlorinación, situadas en la ruta “upstream”, y catalizadas por la HCH dehidroclorinasa (LinA). Su gen no se ha descrito únicamente en solitario, sino que en cepas como *S. indicum* B90 se han encontrado dos genes ortólogos, designados como *linA1* y *linA2*. Es considerado un gen esencial en microorganismos degradadores, y parece que se expresa constitutivamente⁽¹¹⁾. Adicionalmente, LinA (16.5 kDa) no requiere cofactores para su actividad, lo que la convierte en una dehidroclorinasa única, sin homólogos cercanos^(5,12).

En cuanto al gen *linB*, el dominio catalítico mayor de la haloalcano dehalogenasa LinB pertenece a una superfamilia α/β -hidrolasa amplia y bien caracterizada, que usualmente llevan a cabo reacciones hidrolíticas mediante una tríada catalítica. La ruta degradadora puede comenzar, dependiendo del isómero, por la acción de LinA o LinB. Por lo tanto, cualquiera de estos dos genes es imprescindible en un microorganismo con actividad degradadora que utilice la ruta de degradación *lin*.⁽⁵⁾

Estos dos genes, tanto *linA* como *linB*, tienen una expresión constitutiva dentro de las bacterias con capacidad degradadora. Dentro de la ruta “downstream”, los genes *linD* y *linE* parecen encontrarse organizados dentro de un operón con un regulador transcripcional “upstream”, *linR*. La expresión de ambos genes es inducible por la presencia de sus sustratos⁽¹¹⁾.

La distribución de estos genes en los genoma de las distintas bacterias degradadoras de lindano sigue siendo objeto de estudio, y no se conoce exactamente dónde están localizados. Se sabe que se encuentran en regiones separadas del cromosoma bacteriano, y no están organizados de manera coordinada en operones regulados. Estudios recientes han revelado que algunos de estos genes *lin* no están uniformemente distribuidos en el cromosoma, sino que también están presentes en plásmidos, en cepas como *S. indicum* B90A, *S. japonicum* UT26 y *S. francesce* Sp⁺⁽¹²⁾. Se han encontrado además copias de regiones IS6100 flanqueando varios de estos genes *lin* en *S. japonicum* UT26, sugiriendo la adquisición de estos mediante transferencia horizontal. IS6100 es un miembro de la familia IS6, que puede movilizar genes entre dos elementos IS6100 directamente repetidos a través de la fusión de replicones y consiguiente resolución mediante recombinación homóloga. El resultado es la integración del operón en el plásmido⁽¹³⁾. La transferibilidad genética de estos genes es pertinente en la adaptación a los ambientes contaminados⁽¹²⁾.

Metagenomas de muestras de suelo han sido secuenciados para evaluar la presencia de los genes *lin* en sitios contaminados. Estos estudios han revelado que la prevalencia de los genes *lin* de la ruta “upstream” (*linA* y *linB*) está correlacionada con el nivel de contaminación por HCH en

el suelo, sugiriendo que existe una presión selectiva hacia la adquisición de estos genes *lin* transmisibles en comunidades de suelos contaminados⁽¹⁴⁾.

3 OBJETIVOS

El objetivo último de este trabajo es aportar datos de la actividad metabólica presente en los suelos y la presencia de genes *lin* en los vertederos de Bailín y Sardas (Sabiñánigo, Huesca) con la intención de sentar bases que puedan mejorar la utilización de bacterias para la biorremediación de suelos.

Considerando la bibliografía consultada, se establecieron una serie de experimentos que continuaran el trabajo del grupo de “Restauración Ecológica”, del departamento de Conservación de la Biodiversidad y Restauración de Ecosistemas del Instituto Pirenaico de Ecología (CSIC), en relación con los consorcios bacterianos situados en las tierras contaminadas por HCH en Sabiñánigo (Huesca). Los objetivos concretos que se han abordado en este trabajo son los siguientes:

- ❖ Análisis de la respuesta metabólica de las comunidades bacterianas de los suelos contaminados con diferentes cantidades de lindano y su repercusión en esta huella metabólica.
- ❖ Búsqueda de genes *lin* que se puedan utilizar como potenciales marcadores de la presencia de bacterias degradadoras de lindano.
- ❖ Estudio de la presencia de genes *lin* en comunidades microbianas de suelos expuestos a lindano durante largos periodos de tiempo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Muestras utilizadas en el estudio

Las muestras de suelo se seleccionaron en función de la cantidad de γ -HCH y de la riqueza metabólica que mostraron durante los experimentos realizados por el grupo de Restauración Ecológica, del departamento de Conservación de la Biodiversidad y Restauración de Ecosistemas del Instituto Pirenaico de Ecología (CSIC) en 2018. Este proyecto tiene como objetivo buscar y aislar consorcios bacterianos autóctonos que muestren actividad degradadora de residuos de lindano.

Para dicho proyecto, tomaron muestras de las zonas más contaminadas: los vertederos de Bailín (7 muestras) y Sardas (5 muestras), y los alrededores de la fábrica de Inquinosa (2 muestras). Los suelos que mayor actividad metabólica presentaron fueron los correspondientes a las muestras de Bailín 6,7, y 8; Inquinosa 1 y 2 y Sardas 3, de los cuales Bailín 2,6 Inquinosa 1 y Sardas 3 fueron seleccionados para los trabajos de campo. Se nombraron: INQ-1, BAI-6 y SAR-3 respectivamente.

Los análisis fisicoquímicos de estas tierras seleccionadas se muestran en la Tabla 4.1, con los valores para los diferentes isómeros de HCH.

Isómeros HCH (mg/kg)	BAI-2	BAI-6	INQ-1	SAR-3	SAR-1
α -HCH	0.0086	0.1897	0.1285	0.0408	605.2622
β -HCH	0.4972	0.0841	4.6116	0.0666	24.6542
γ -HCH	0.0259	0.1199	0.2371	0.0759	1601.1354
δ -HCH	0.0220	0.4858	0.5449	0.0462	986.2709
ϵ -HCH	0.0081	0.2078	0.1690	0.0348	136.7626

Tabla 4.1. Cantidades de los diferentes isómeros HCH en tierras recogidas por el de Restauración Ecológica, del departamento de Conservación de la Biodiversidad y Restauración de Ecosistemas del Instituto Pirenaico de Ecología (CSIC)

Las muestras seleccionadas para este trabajo fueron BAI-6, INQ-1 y SAR-1, representativas de las 3 localizaciones primarias de contaminación. Las cantidades de isómero γ fueron determinantes en la elección de las muestras. Los suelos seleccionados presentan un rango amplio de γ -HCH; bajas concentraciones en BAI-6 y muy elevadas en SAR-1. Ello permitiría explorar la influencia de este compuesto en la actividad metabólica de las poblaciones microbianas de estos suelos.

Además de las muestras de suelo, se disponía de muestras de poblaciones bacterianas procedentes de los estudios con los Biolog Ecoplates^{®(15)} de suelo, conservadas a -80°C de estudios anteriores (los descritos en párrafos anteriores). Estas muestras fueron manipuladas, almacenadas y puestas a disposición por IPE-CSIC.

4.1.1 Muestreo de materiales frescos

Se realizaron re-muestreos de tierra en localizaciones próximas las muestras originales, con el objetivo de comprobar si la presencia -persistente- de lindano tiene algún tipo de presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas. Las tierras obtenidas se encontraban entre 100-200 m alejadas del muestreo original en las localizaciones de Inquinosa y Bailín, y hasta 300 m alejadas del punto de muestreo original en Sardas.

Las muestras obtenidas fueron tierras mezcladas con lodos de la misma zona. Fueron nombradas como: Inquinosa 0 (INQ-0), Bailín 0 (BAI-0) y Sardas 0 (SAR-0).

4.2 Enriquecimiento de poblaciones bacterianas en tierras contaminadas

Se cultivaron 5 gramos de cada tierra con 15 ml de medio LB y medio mínimo M9 en Falcon de 50 ml, en agitación continua a 25 °C.

El medio LB se compone de peptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 2 g/L en agua destilada. El medio M9 sin embargo, es un medio no suplementado, que se forma por una mezcla de sales: Na₂HPO₄ anhidro 15,17 g/L, KH₂PO₄ anhidro 3 g/L, NaCl 0,5 g/L y NH₄Cl 1 g/L suplementado con 2,5 ml/L de *Goodies*, de composición: 25% v/v FeSO₄·7H₂O, 25% v/v MgSO₄ 1M y 50% de un stock de sales. El stock de sales lleva MgO 10,75 g/L, CaCO₃ 2 g/L, CoCl₂ 0,13 g/L, FeSO₄·7H₂O 4,5 g/L, MnSO₄·1H₂O 0,92 g/L, CuSO₄·5H₂O 0,25 g/L, ZnSO₄·7H₂O 1,48 g/L, H₃BO₃·7 H₂O 0,06 g/L y HCl concentrado 51,3 ml/L en agua destilada. Una vez los medios preparados en los respectivos Falcon con la tierra pesada y 15ml del medio mínimo, se añadió 1,5 μ L de una solución stock de γ -HCH 0.07 mg/mL en DMSO.

Se realizó un pase de 1 ml de cultivo de los medios M9 a un nuevo tubo Falcon de 50 ml a los 6 días de la siembra con 15 ml de nuevo medio mínimo, con la composición ya indicada anteriormente. Estos tubos Falcon se dejaron en cultivo 2 semanas completas en agitación a temperatura ambiente. El agitador utilizado fue Biogen Científica SkyLine S-3.08M.

4.3 Protocolo EcoPlates BIOLOG®

4.3.1 Extracción bacteriana

Se prepararon en Falcons de 50 ml en los que se pesaron 10 gramos de los suelos muestra: INQ-1, BAI-6, SAR-1, y una tierra control, obtenida en las proximidades del Instituto Pirenaico de Ecología (IPE-CSIC), Zaragoza. Las muestras de suelo se procesaron para la extracción bacteriana siguiendo el protocolo de Kayayama et al (1998), con modificaciones de Ikeda et al (2004).

Lo 10 gramos de suelo fueron resuspendidos en 95 ml de H₂O MiliQ estéril y homogenizados durante 15 minutos a 150 rpm en un el agitador Infors HT Labotron Brosen Centrifuga,S.L. 10 ml de la mezcla homogenizada se llevaron a un Falcon de 50 ml estéril y se procedió a la sonicación en baño durante 1 minuto. Se centrifugó a 2500 rpm (1000 x g) en la centrifuga ALRESA durante 10 minutos y se recuperan 9,5 ml del sobrenadante con una pipeta de 10 ml a otro Falcon de 50 ml estéril. Se volvieron a añadir al precipitado de la centrifugación 9,5 ml de H₂O estéril, se resuspendió con la mano, y se volvió a sonicar y a centrifugar. El sobrenadante recuperado se fue añadiendo al Falcon de la primera recuperación. Se repitieron los pasos hasta hacer 5 centrifugaciones. El total de sobrenadante recuperado tras este protocolo fue de 47,5 ml.

Por último, se hizo una centrifugación del volumen total 47,5 ml para eliminar las partículas del suelo, a 2500 rpm 10 minutos. Con el sobrenadante se inoculó 150 µL en cada pocillo de las placas EcoPlates con una pipeta multicanal dentro de la campana de flujo laminar, en condiciones estériles.

4.3.2 Incubación y medición de la absorbancia

Las placas BIOLOG EcoPlates contienen 96 pocillos, los cuales están repartidos en 3 réplicas con 31 fuentes de carbono diferentes [Anexo 9.4], y un blanco por réplica. Cada pocillo contiene sal de tetrazoilo -indicador redox-, que se reduce en presencia de reacciones de oxidación causadas por la respiración de los microorganismos, virando a color morado. EL color se mide espectrofotométricamente a $\lambda=590\text{m}$ ⁽¹⁵⁾.

El espectrofotómetro para leer absorbancias es un Anthos 2010 microplate reader (de Biochrom), que realiza lecturas automáticas de cada uno de los pocillos de la placa a 590 nm y lo registra de forma digital por medio del programa ADAP 2.0 de la misma casa. Se realizó una lectura tras la inoculación, a t=0, y se procedió a hacer lecturas cada 12/24 horas. Tras cada lectura, las placas se mantuvieron en aislamiento dentro de un incubador (Pol-Eko Aparatura) a 25°C en oscuridad, dentro de la funda original.

4.3.3 Análisis estadístico

Las medidas de absorbancia contenían 3 replicados para cada muestra, en diferentes tiempos. Para el análisis se manejaron los datos con el software estadístico R a través de la aplicación de escritorio *Rstudio*. Se utilizaron los paquetes “drm”, “drc” y “drfit”, especialmente diseñados para el trabajo con curvas dosis-respuesta⁽¹⁶⁾.

Tras la normalización de los datos, estableciendo un máximo de 100 (%) y un mínimo de 0, se ajustan estos datos obtenidos a una función log-logística con 4 parámetros. En el eje de las X tendremos el tiempo (en horas) en escala logarítmica, mientras que el eje de las Y corresponde al efecto, medido en absorbancia gracias al lector de placas.

El ajuste log-log sigue la siguiente función:

$$f(x) = C + \frac{d - c}{1 + \exp(b(\log(x) - e))}$$

Figura 4.6: Función log-logística indicada con sus respectivos parámetros: **d**: máximo; **c**: mínimo; **b**: la pendiente; **e**: la TM50 : Tiempo en el que la comunidad microbiana genera el 50% del color máximo.

El parámetro TM50 en el caso de la respuesta metabólica media, correspondería el tiempo en el que la comunidad ha desarrollado el 50% de su capacidad metabólica máxima. Nos centraremos en la TM50 de estas curvas para hacer la comparación entre las comunidades.

4.4 Puesta a punto de extracción de DNA a partir de muestras de suelos

La extracción del DNA se realizó siguiendo 3 protocolos diferentes: digestión mecánica, kit comercial y digestión enzimática.

4.4.1 Técnica fenol-cloroformo con digestión mecánica (*Protocolo 1*)

Protocolo descrito por Cai and Wolk (1990) realizado para extraer DNA de las muestras ultracongeladas de cultivos provenientes de las tierras BAI-6, INQ-1, SAR-1 , proporcionados por el IPE-CSIC.

Se centrifugaron 15 ml de muestra ultracongelada en la centrifuga Allegra X-30R durante 15 min a 4000 rpm (3082 x g) y temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en 400 µL de TRIS-HCL 10mM pH 8, EDTA 0.1 mM. Se añadieron 20 µL de SDS 10%, 450 µL de fenol-cloroformo (1:1) y 3 puntas de espátula de perlas de vidrio, y se realizaron cuatro ciclos de 1 minuto de agitación en vórtex, 1 minuto de reposo en hielo. Se centrifugó durante 15 minutos a 13000 rpm (11480 x g) y 4°C en la centrifuga Eppendorf 5427R, y se transfirió la parte superior acuosa a tubos Eppendorf nuevos. Se lavaron las células de forma sucesiva con 1 volumen de fenol/1 vol. de cloroformo (1:1) y 2 veces con 1 vol. de cloroformo hasta conseguir una fase acuosa completamente incolora. En todos los lavados se descartó la fase orgánica inferior. Se añadió a la fase acuosa 1 vol. de acetato de sodio 3M pH=5.2 y 2 vol. de etanol absoluto frío y se incubó durante la noche a - 80°C para conseguir la precipitación del DNA. Por último, se centrifugó durante 15 minutos a 4°C y velocidad máxima. El DNA obtenido se lavó con etanol al 70% frío y se dejó secar 30 minutos y finalmente se resuspendió en 25 µL de agua MQ estéril.

4.4.2 Kit comercial (*Protocolo 2*)

Utilización del kit de extracción de DNA para muestras ambientales ZymoBIOMICS™ D4300T Mini Prep Kit, de ZYMO RESEARCH ®, siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las soluciones y tubos utilizados durante la extracción fueron proporcionados en el kit.

Se añadieron 250 mg de muestra de suelo a cada tubo de lisis, que se componía de perlas de lisis de 0.1 y 0.5 mm de diámetro. Se añadió la solución de lisis y se procesó en el FastPrep®-24. El tiempo de disrupción celular fue de 5 minutos, para el que se repitieron ciclos de 1 minuto a máxima velocidad en el FastPrep. Se centrifugaron los tubos después de la lisis en una microcentrífuga durante 1 minuto a 12100 rpm (10000 x g) y se transfirieron 400 µL del

sobrenadante al tubo con filtro III-F. La filtración se hizo por centrifugación a 10800 rpm (8000 x g) 1 minuto, y se descartó el filtro. Se añadieron 800 µL de buffer de DNA y 400 µL de etanol 95% al filtrado. Se resuspendió y pasaron 800 µL de la mezcla a la columna IICR, centrifugando para unir el DNA a 12100 rpm (10000 x g) 1 minuto. Se repitió este paso y se descartaron las fracciones excluidas.

Para purificar el DNA unido a la columna, se hicieron varios lavados con los tampones de lavado 1 y 2 mediante centrifugaciones a 12100 rpm (10000 x g) 1 minuto. La extracción final se realizó incubando la columna con el agua libre de DNAsas/RNAsas 1 minuto. Se centrifugó a 12100 rpm (10000 x g) durante 1 minuto y se transfirió este DNA eluido a la columna III-HCR preparada en un Eppendorf de 1.5 ml. Se centrifugó 13000 rpm (11400 x g) durante 3 minutos y se obtuvo el DNA purificado.

4.4.3 Técnica fenol-cloroformo con digestión enzimática (Protocolo 3)

Se utilizó el método descrito por Neilan et al. , (1999).

Se comienza con una centrifugación del sobrenadante de los medios con tierra en Falcons de 15 ml. Se recogieron 10 ml para el medio LB y 8 ml para el medio mínimo. Se centrifugó a 4000 rpm (3082 x g) durante 20 minutos, hasta la formación de un pellet y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 500 µL de tampón Tris-HCL 50 mM pH 8.5, 5 mM de EDTA, 50 mM NaCl para los cultivos con medio mínimo. Los cultivos de LB fueron resuspendidos en 1000 µL de tampón, debido a la cantidad de pellet presente. Se añadió lisozima, 50 µL de un stock de 10 mg/ml, para que quedara una concentración final de 1 mg/ml. Al medio LB se le añadieron 100 µL y se incubó durante 30 min a 56 °C. A continuación, se añadieron 5 µL de proteinasa K (stock 20 mg/ml) y 20 µL de SDS al 10% y se incubó a 56 °C durante 40 minutos en el bloque térmico (doble cantidad para el medio LB). Se lavó 2 veces con fenol 1:1, una con fenol, cloroformo 0,5:0,5;1 (v:v:v) y por último con cloroformo 1:1 (v:v). Entre medio se dio golpe de vórtex y centrifugación durante 1 min a 8000 rpm. Se separó la fase superior acuosa que contenía el DNA. Para terminar, se añadieron 0,1 volúmenes de acetato de sodio (3M pH=5.5) y 2 volúmenes de etanol absoluto, se agito con el vórtex y se dejó precipitar durante aproximadamente 2 horas a - 20°C. Posteriormente se centrifugó 20 minutos a 13000 rpm (11400 x g) y 4°C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Una vez seco, el pellet se resuspendió en 30 µL de agua MiliQ estéril (60 µl en caso del LB).

4.4.4 Cuantificación del DNA

Para la cuantificación del DNA se utilizó el espectrofotómetro NanoVue Plus TM de BioChrom (Harvard Bioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las mediciones para la cuantificación en el NanoPore se realizaron a una longitud de onda de 260 nm, a la que absorben los ácidos nucleicos, 260 nm y 230 nm, valores que permiten estipular la pureza de la muestra extraída. El valor 260/280 es el parámetro para determinar la calidad del DNA, y debe de estar entre 1,8 y 2 para asegurar que la calidad del DNA es aceptable.

4.5 Ensayos de PCR

La PCR se realizó siguiendo el protocolo estándar de PCR conteniendo en cada tubo de PCR las cantidades de cada reactivo que aparecen en la tabla 9.3.1 [Anexo 9.3].

Se utilizó el termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler. El programa de PCR consistió en 3 minutos a 95°C seguidos de 30 ciclos de los siguientes pasos: Desnaturalización 1 min a 95°C, hibridación 1 min a 54°C (según los oligonucleótidos utilizados), extensión 1 min a 72°C. La PCR finalizaba con una incubación 10 min a 72°C y un paso a 4°C hasta que se retiraban las muestras. El revelado de la PCR se realizó mediante un gel de Agarosa 1% con Bromuro de Etidio. El marcador de peso molecular es el Gene Ruler 1 kb DNA Ladder de ThermoScientific®.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

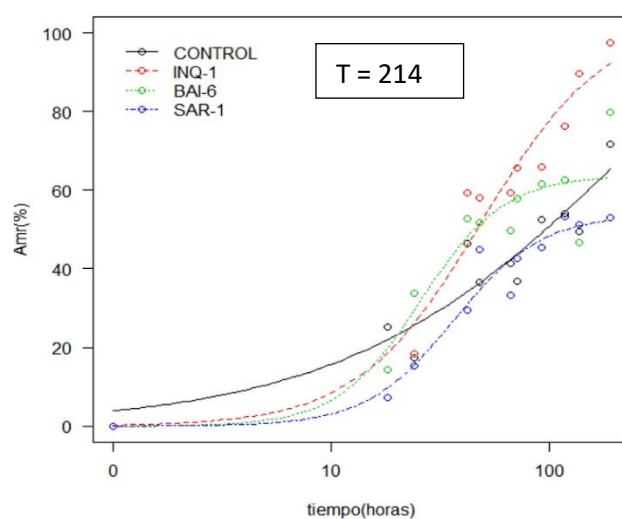
5.1 Estudio del perfil metabólico con BIOLOG Ecoplates®

Con objeto de evaluar de forma general las capacidades del microbioma de los suelos contaminados contenidos en el estudio, se llevaron a cabo cultivos con el sistema BIOLOG. Gracias a este sistema, se comprobó que mediante la inoculación de mezclas microbianas se podían generar datos fisiológicos representativos de comunidades microbianas. Dado que las comunidades procariotas pueden ser consideradas unidades funcionales caracterizadas por la suma de las propiedades metabólicas de bacterias individuales, el estudio fisiológico a nivel de comunidades (CLPP) representa un método apropiado y rápido para evaluar el potencial metabólico de diferentes muestras microbianas.^(15,17)

5.1.1 Análisis de la respuesta metabólica media (AMRs)

La respuesta metabólica media calculada describe la utilización media de las 31 fuentes de carbono [Anexo 9.4] por la comunidad microbiana en estudio, y proporciona un parámetro con el que podemos establecer comparaciones entre comunidades microbianas.

Este parámetro ha sido calculado como la media de las medidas obtenidas sustrayendo la medida del blanco, el agua en cada réplica, a cada fuente de carbono. Se realizaron medidas hasta las 214 horas, siendo al principio más frecuentes dado el rápido cambio de color en las primeras 48 horas que desarrollan las placas, y luego más espaciadas en el tiempo, hasta las 214 horas.



Gráfica 5.1. Curvas dosis-respuesta correspondientes a las respuestas metabólicas medias de las comunidades microbianas alojadas en las muestras de suelo contaminado con lindano: INQ-1, BAI-6, SAR-1; y un Control proveniente de comunidad microbiana de suelos limpios en las proximidades del Instituto Pirenaico Ecología (CSIC).

El control que incluimos en el estudio proviene de suelos con carácter alcalino (pH=8.79) y morfología diferente a las tierras recogidas en las localidades próximas a Sabinánigo. Es esto por lo que los parámetros de respuesta metabólica no son comparables a las de las tierras contaminadas, ya que su microbioma será diferente. Sin embargo, se puede observar como el control tarda menos tiempo en arrancar la AMR, y que no llega a estabilizar del todo, encontrándose todavía en fase exponencial a las 214 horas. Las capacidades metabólicas de esta comunidad de un suelo libre de organoclorados se presentan bastante diferentes de las muestras contaminadas.

Las muestras procedentes de las tierras contaminadas con lindano presentan diferencias en sus respuestas metabólicas, cómo se observa en la gráfica 8.1. La comunidad perteneciente a Inquinosa presenta la mayor capacidad de metabolizar los sustratos de carbono.

Parámetro función		Estimate	Std. Error	t-value	p-value	
Pendiente	b:INQ-1	-1.5312	0.6775	-2.2601	0.026229	*
	b:BAI-6	-2.2799	1.7291	-1.3186	0.190659	
	b:SAR-1	-2.1584	1.3042	-1.6549	0.101423	
TM50	d:INQ-1	103.6408	26.6113	3.8946	0.000189	***
	d:BAI-6	63.7608	10.1655	6.2723	1.22E-08	***
	d:SAR-1	53.8373	10.8726	4.9517	3.42E-06	***
Máximo	e:INQ-1	48.7134	20.922	2.3283	0.022135	*
	e:BAI-6	25.609	6.4409	3.976	0.000141	***
	e:SAR-1	36.4127	11.5573	3.1506	0.002212	**
Códigos significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						
Error estándar residual: 18.15375 (90 degrees of freedom)						

Tablas 5.1 Ajuste de los datos medidos en las 3 réplicas de las EcoPlates a 214h para la respuesta metabólica media (AMR) para las tierras incluidas en este estudio: INQ-1, BAI-6, SAR-1.

Los valores t y p correspondientes son para probar las hipótesis nulas de que los parámetros son iguales a 0. El valor p lo consideramos significativo para valores menores a 0.1. La comparación estadística entre los parámetros se realizó utilizando la función "ComParm" del programa estadístico R.

Comparación parámetro 'b' (pendiente)				
	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
INQ-1/BAI-6	0.66064	0.4967	-0.6832	0.4961
INQ-1/SAR-1	0.80653	0.54622	-0.3542	0.7239
BAI-6/SAR-1	1.22083	1.05192	0.2099	0.8342
Comparación parámetro 'e' (F50)				
	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
INQ-1/BAI-6	1.9685	0.82224	1.1779	0.2417
INQ-1/SAR-1	1.24442	0.6132	0.3986	0.691
BAI-6/SAR-1	0.63217	0.26104	-1.4091	0.1619

Comparación parámetro 'd' (máximo)				
	Estimate	Std. Error	t-value	p-value
INQ-1/BAI-6	1.65861	0.39161	1.6818	0.09576 *
INQ-1/SAR-1	1.81418	0.52074	1.5635	0.12113
BAI-6/SAR-1	1.0938	0.26528	0.3536	0.72441

Tabla 5.2 Valores estadísticos de la comparación de los parámetros de las funciones generadas por el ajuste log-logístico de las curvas dosis respuesta correspondientes a las medidas de las absorbancias medias (AMRs).

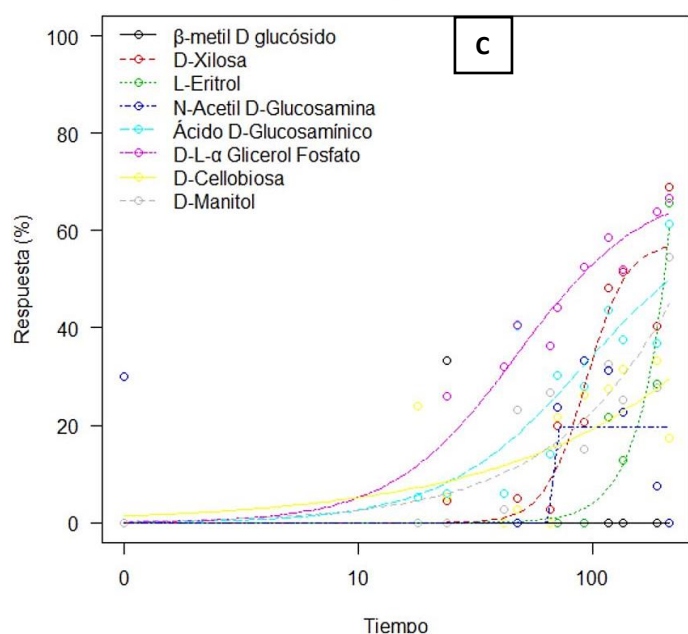
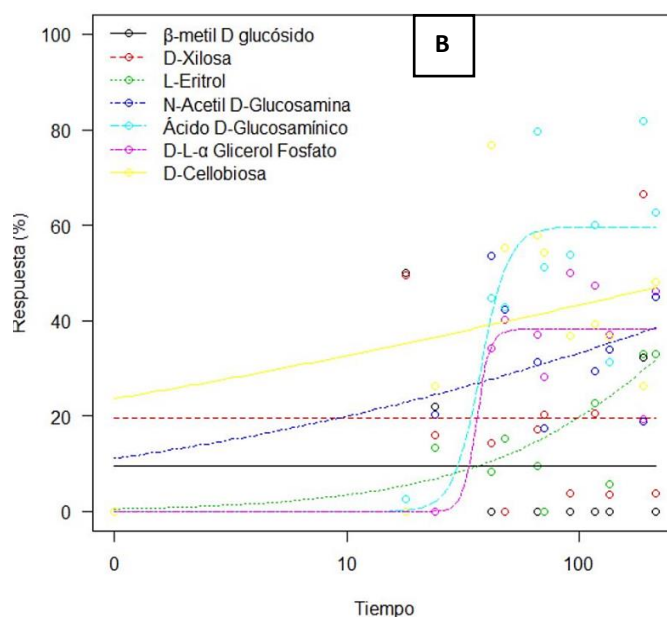
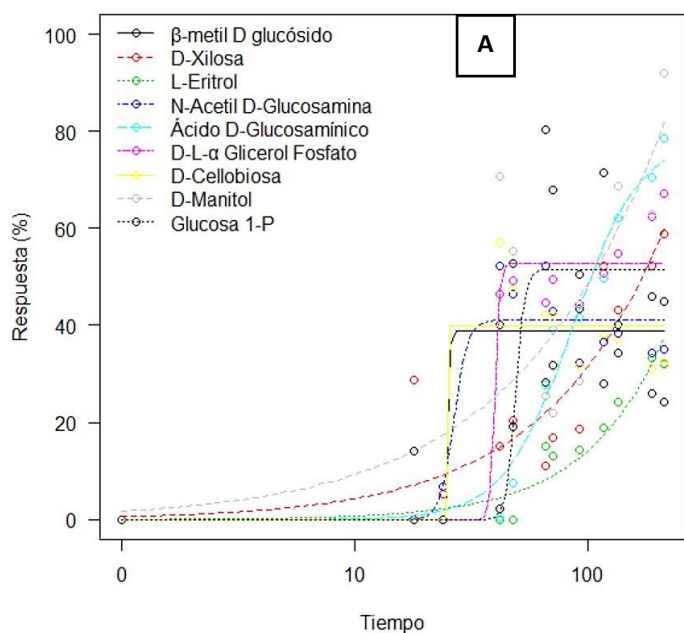
Las comparaciones indican que no hay diferencias significativas en cuanto a la TM50 entre los diferentes consorcios bacterianos estudiados. Sin embargo, la comparación del máximo de estabilización de la curva presenta un p-value muy cerca de la significación (0.1), por lo que podríamos establecer una tendencia a diferenciarse entre la muestra INQ-1 y las muestras BAI-6 y SAR-1. Esta diferencia es apreciable en la gráfica 8.1.

La comunidad microbiana de Inquinosa presenta una mayor capacidad metabólica media AMR, hecho que podría explicarse por tener una concentración de lindano presente en el medio baja: 0.2371 mg/kg de tierra analizado. Las otras muestras estudiadas: BAI-0.1199 mg/kg, SAR-1601.14 mg/kg.

5.1.2 Análisis de la utilización de carbohidratos

Las bacterias exhiben una gigantesca versatilidad metabólica de uso de nutrientes: desde autótrofos que obtienen su carbono por reducción del CO₂ y los demás elementos a partir de fuentes igualmente inorgánicas, hasta heterótrofos capaces de usar amplia gama de fuentes orgánicas de carbono. En este estudio nos hemos fijado con detalle en las fuentes de carbono de naturaleza glucídica.

Durante el modelado y procesado de los datos, se observó que algunas réplicas no llegan casi ni a arrancar (son estas en las que la casi totalidad de sus mediciones de absorbancia daban 0). Ello puede deberse a una incompleta homogenización de las suspensiones de bacterias al realizar la extracción y siembra. Por ello para el estudio de la respuesta a azúcares de BAI-6, utilizamos únicamente las réplica 1 y 2. Se realizaron medidas hasta las 214 horas, siendo cada 6-12 horas las primeras 60 horas, cuando se producen los mayores cambios de absorbancia por el comienzo de la utilización de los recursos, y por tanto fase exponencial, y luego medidas más secada 24-48 h.



Gráficas 5.1.3: A. Estudio de la metabolización de azúcares en la comunidad microbiana de **Inquinosa**. Leyenda: las 9 fuentes de carbono de naturaleza glucídica estudiadas en el análisis- β -metil D glucósido; D-Xilosa; L-Eritrol; N-Acetil D-Glucosamina; Ácido D-Glucosamínico; D-L- α Glicerol Fosfato; D-Cellobiosa; D-Manitol; Glucosa 1-P/ **B.** Estudio de la metabolización de azúcares en la comunidad microbiana de **Bailín**. Graficados los datos de los compuestos que se ajustaban al análisis log-log con Rstudio, indicados en la Leyenda. / **C.** Estudio de la metabolización de azúcares en la comunidad microbiana de **Sardas**. Análogo a B.

La comunidad microbiana procedente de las tierras de INQ-1 parece ser la que más respuesta metabólica ha tenido a las fuentes de carbono de carácter glucídico. Los datos recogidos para las 9 fuentes de carbono se han ajustado todos a las curvas de dosis-respuesta con un nivel de significancia adecuado, alcanzando diferentes máximos de estabilización siendo, D-Manitol, ácido D-Glucosamínico y D-Xilosa los compuestos que más respuesta han revelado.

Los estudios de la utilización de azúcares por parte de las comunidades englobadas en BAI-6 y SAR-1 sin embargo no presentaron una utilización tan amplia de estos recursos. Las gráficas 5.3 reflejan que el número de ajustes que se pudo realizar es inferior, y algunos datos de compuestos no ajustan al modelo log-log, quedando representados dichos modelos como rectas.

La comunidad bacteriana de BAI-6 es la que peor ajuste de datos ha presentado [*Datos del ajuste estadístico recogidos en el Anexo 9.7*], dado que muchas de las respuesta a azúcares registradas

han sido fruto de variaciones pequeñas de absorbancia que no han seguido una tendencia clara, y por tanto no han ajustado al test dosis-respuesta realizado. En la gráfica 5.3B se puede observar que compuestos como el β -metil glucósido o la D-Xilosa no han dado respuesta, además de la Glucosa 1-P y Manitol, cuyas medidas eran completamente 0, consecuentemente no se han podido ajustar a ningún modelo.

SAR-1 ha presentado un mejor ajuste de los datos, dando respuesta a todos los compuestos a excepción del β -metil glucósido y la Glucosa 1-P (no figurante en la gráfica, respuesta total 0). La comparación de los máximos de la función indica que sin embargo la comunidad de Inquinosa ha tenido generalmente respuestas más elevadas a las diferentes fuentes de carbohidratos. Esta alta diversidad metabólica por parte de las bacterias presentes en los suelos de INQ-1 coincide con los datos de la respuesta metabólica media estudiada en la gráfica 5.1.

Un resultado interesante sería la elevada respuesta a la Celobiosa y D-Xilosa por parte de la comunidad microbiana de Sardas. Estos carbohidratos proceden de la metabolización de estructuras vegetales, sin embargo, las muestras de SAR-1 proceden de la balsa de lixiviados situada en el vertedero de Sardas, con concentraciones de lindano muy por encima de las otras dos muestras, y sin vegetación aparente dentro de la balsa.

Por tanto, la respuesta metabólica más baja corresponde a las comunidades microbianas procedentes de Bailín, siendo difícil el ajuste a modelos. Sin embargo, las comunidades microbianas de Sardas y Bailín no son diferenciables en nuestro estudio en funciones de la respuesta metabólica media. Es posible que mientras los microbiomas procedentes de la balsa de lixiviados de Sardas dan una mayor respuesta a los carbohidratos, los microbiomas de BAI-6, procedente de muestras en terrenos con vegetación a los alrededores del vertedero de Bailín estén consumiendo más las fuentes proporcionadas por los aminoácidos u otros compuestos en el BIOLOG EcoPlate.

La comunidad SAR-1 proveniente de la balsa de lixiviado con cantidades de Lindano muy por encima de la media en las tierras de alrededor (1601.14 mg/kg), cabría de esperar un efecto tóxico notable a nivel de diversidad metabólica o respuesta metabólica media. Sin embargo, este efecto no es visible en nuestro estudio. La actividad metabólica a cantidades tan altas del isómero γ -HCH proporciona una esperanzadora comunidad de estudio, donde las bacterias podrían estar sobreviviendo a través de la degradación de los organoclorados presentes en el medio.

A su vez, INQ-1 es la comunidad que mayor respuesta media e individual a azúcares ha proporcionado. Es por tanto la comunidad con mayor potencial para degradar los sustratos de carbono presentes en las EcoPlates (y que son los más habituales en suelos forestales), y una comunidad rica en variabilidad microbiana.

5.2 Puesta a punto de extracción de DNA a partir de muestras de suelos

Las muestras ultracongeladas con las que comenzamos el estudio fueron proporcionadas por el IPE-CISC, provenientes del estudio de las comunidades microbianas de los suelos contaminados utilizados en este trabajo ⁽¹⁵⁾. El método de extracción de este microbioma fue similar al utilizado en este trabajo para la inoculación de las EcoPlates BIOLOG[®], en el que los suelos eran homogenizados con agua mili Q, y tratados mediante sucesivas sonicaciones y centrifugaciones.

La extracción del DNA genómico de las muestras de suspensiones bacterianas ultracongeladas se realizó utilizando la técnica fenol-cloroformo, descrito en materiales y métodos, representado en la gráfica como *Protocolo 1*. (Figura 3). Los rendimientos de esta extracción obtenidos fueron 0.3025 µg DNA/g suelo para las muestras provenientes de INQ-1; 0.0475 µg DNA/g para BAI-6 y 2.2875 µg DNA/g para SAR-1 respectivamente.

En vista de los bajos rendimientos de esta primera extracción, se decidió cambiar el método de extracción y se optó por extraer el DNA directamente de las muestras de suelo proporcionadas, con el Kit ZymoBIOMICS Research, (*Protocolo 2*). Los rendimientos de esta extracción, 23.76 µg DNA/g suelo para INQ-1, 29.04 µg DNA/g para BAI-6 y 13.2 µg DNA/g para SAR-1, indicaron que la población bacteriana era muy escasa y que la baja cantidad de DNA obtenido comprometía la identificación de genes por PCR.

Ante estos resultados, se optó por el enriquecimiento de las tierras con el objetivo de maximizar la cantidad bacteriana presente, para conseguir rendimientos mayores que permitieran obtener cantidades de DNA suficientes para hacer las PCRs. Además, se optó por cambiar el protocolo de extracción, pasando de una lisis mecánica (bolas de vidrio-*Protocolo 1*, Fast Prep -*Protocolo 2*) a una lisis enzimática (lisozima, proteinasa K - *Protocolo 3*).

El medio LB es nutricionalmente rico, y es un medio utilizado para el crecimiento y mantenimiento de cultivos, mientras que el medio M9, sin embargo, es un medio no suplementado, que se forma por una mezcla de sales con los componentes esenciales para el mantenimiento celular, excepto el carbono. Su composición permite estudiar el efecto de diversos nutrientes adicionados en las poblaciones en estudio. El medio LB, se utilizó para enriquecer, la población global bacteriana presente en las tierras. Y el medio M9 suplementado con lindano con el fin de aumentar de una manera selectiva las bacterias que utilizaran éste como única fuente de carbono.

Para monitorizar el enriquecimiento, se realizó un seguimiento del crecimiento de los cultivos mediante medición de la absorbancia con espectrofotómetro y así garantizar que la densidad del cultivo era suficiente para asegurar un rendimiento de DNA mayor (Figura 3).

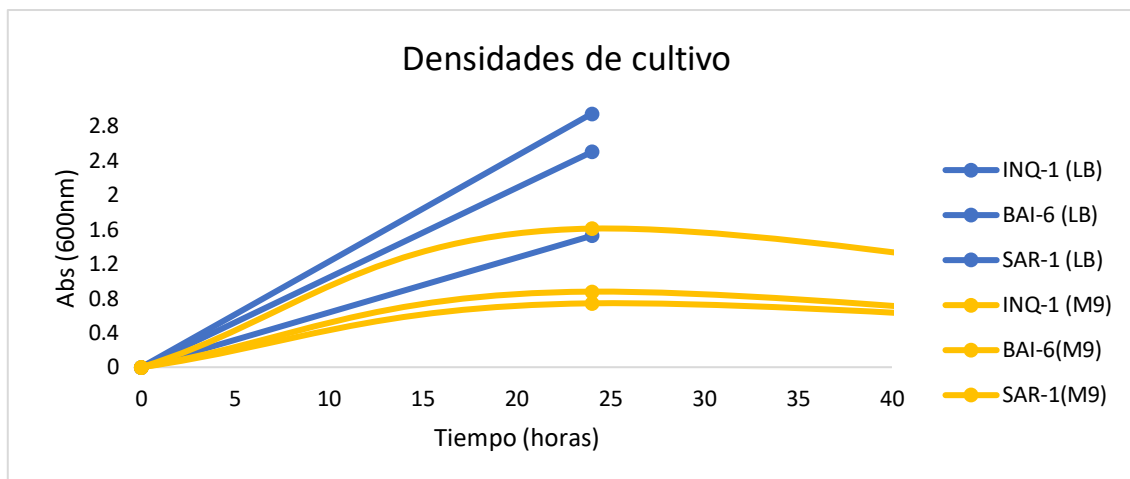


Figura 3. Curvas de crecimiento de muestras para su enriquecimiento. Los cultivos crecidos en medio LB se representan en azul mientras que los crecidos en M9 con lindano se representan en amarillo

Como se observa en la figura 3, los cultivos en medio LB crecieron de forma exponencial en tan solo 24 horas, por lo que se procedió a la extracción y centrifugación en ese mismo día. Sin embargo, el crecimiento en medio M9 con lindano fue mucho más lento por lo que se recogieron las células 5 días después.

Con estas muestras de suelos enriquecidas, aplicamos el *Protocolo 3*, basado en las técnicas de fenol-cloroformo previamente utilizadas, pero con una variación en el método de lisis bacteriana, que esta vez no era mecánica sino enzimática.

Los rendimientos obtenidos gracias a la combinación del enriquecimiento de muestras y el cambio y optimización de protocolo fueron muy superiores a los de las anteriores extracciones: las muestras enriquecidas con LB alcanzaron 289.68, 282.48 y 153.96 $\mu\text{g DNA/g}$ suelo para INQ-1, BAI-6 y SAR-1 respectivamente; mientras que las cultivadas con M9 suplementado con lindano fueron algo inferiores: 54.41, 75.67 y 27.81 $\mu\text{g DNA/g}$ suelo para INQ-1, BAI-6 y SAR-1. Los resultados de los cuatro protocolos se recogen en la Figura 4.

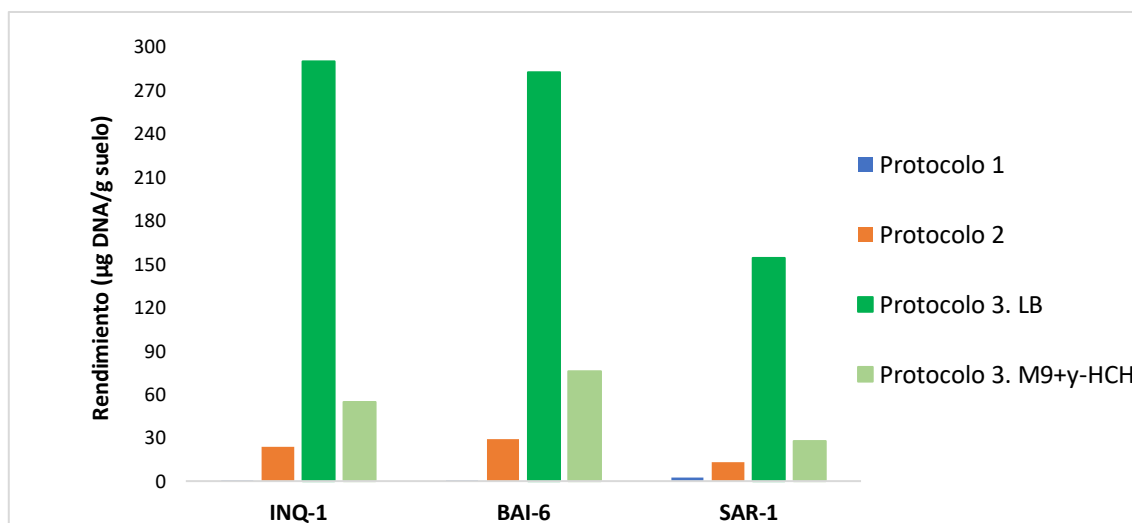


Figura 4 Rendimiento obtenido de los diferentes protocolos de extracción utilizados. Datos recogidos en las tablas correspondientes a [Anexo 9.2]

La clara diferencia en la extracción de DNA microbiano se observa para los enriquecimientos realizados en las muestras de suelos. El LB, al ser una mezcla nutricional óptima para el desarrollo de microorganismos, ha dado las muestras con mayores rendimientos de todas las extracciones. Los medios mínimos suplementados con lindano poseían como única fuente de carbono y energía ser el propio lindano, por lo que se realizó una presión selectiva hacia microorganismos que pudieran utilizar este recurso, presentando como consecuencia menores cantidades de DNA recogido

La puesta a punto del método de extracción de DNA indicó que la extracción mediante métodos enzimáticos parecía ser la más favorable para tratar las comunidades microbianas de los suelos estudiados, pero sin duda esta afirmación está condicionada por la cantidad de bacterias de partida en cada caso.

5.3 Búsqueda de genes *lin* como potenciales marcadores de la presencia de bacterias degradadoras de lindano

En base a una lista de microorganismos aerobios degradadores de hexaclorociclohexano (HCH) comunes de suelo definida en Rup Lal et al (2010) , se comenzó la búsqueda bibliográfica de secuencias pertenecientes a genes de la ruta *lin*. Los genes más caracterizados fueron *linA* y *linB*, dada su importancia en el comienzo de la ruta degradadora. Mayoritariamente se encontraron genes pertenecientes a especies bacterianas englobadas en la familia *Sphingomonaceae*^(5,6,14,18,19), aunque también se encontraron en *Microbacterium*⁽⁷⁾, *Xanthomonas*⁽²⁰⁾ y *Pseudomonas*^(10,21), en los cuales partes de esta ruta había sido caracterizadas, y por tanto secuencias las génicas estaban disponibles.

Con el objetivo de encontrar más secuencias genéticas pertenecientes a la familia *lin* se realizaron búsquedas de secuencias nucleicas homólogas en más géneros bacterianos comunes en suelo con la herramienta BLAST de NCBI, utilizando como gen de referencia los secuenciados en *Shingomonas paucimobilis* B90. Se llevó a cabo la búsqueda con diferentes genes de la ruta degradadora del isómero γ -HCH: *linA*, *linB*, *linE* y *linR*.

Los genes obtenidas con BLAST presentaban elevada homología entre diferentes con géneros de la familia *Sphingomonaceae*: *S. japonicum*, *S. paucimobilis*, *S. francese*, *S. chinhatense* y *S. Gamma 16-1*

En cuanto a *linR*, codificante para el regulador transcripcional de la segunda parte de la ruta degradadora, mostró unas homologías muy bajas (25-30%). En definitiva, este regulador parece encontrarse, hasta lo que se conoce, principalmente en la familia *Sphingomonaceae*⁽⁵⁾, y no parece encontrarse en las demás bacterias.

En base a esta búsqueda, los genes *linB*, *linA* y *linE* se consolidaron como los más frecuentes en bacterias degradadoras de lindano y mejor caracterizados en las bases de datos, y por tanto fueron los escogidos para el diseño de los oligonucleótidos con los que comprobar la presencia de microorganismos degradadores mediante la ruta *lin*.

Una vez se habían identificado genes *lin* que podían ser utilizados como marcadores de la presencia de bacterias degradadoras de lindano, se diseñaron oligos que pudiesen amplificar esas secuencias en muestras de DNA obtenidas de suelos contaminados.

Para el diseño de los oligos se utilizó la herramienta de alineamientos **CLUSTAL**. Con los alineamientos de las especies indicadas en [Anexo 9.5] , se buscaron regiones de elevada homología para el diseño de los oligos consenso. Alineamientos disponibles en [Anexo 9.6].

5.4 Análisis de la presencia de genes *lin* en las muestras de suelo contaminadas por lindano mediante PCRs

Se tomaron las muestras de DNA obtenidas en los protocolos 1 (extracción fenol-cloroformo con digestión mecánica) y 3 (extracción fenol-cloroformo con digestión enzimática) y se llevaron a cabo las PCRs con los oligos diseñados para amplificar los genes *linA*, *linB* y *linE*, diseñados a partir de los alineamientos, con objeto de identificar en los microbiomas del suelo contaminado la presencia de alguno de los genes *lin* seleccionados. Como control positivo de la PCR se utilizó el genoma de *Anabaena*⁽²²⁾ con los oligos para gen *hgptr* y el control negativo se realizó con agua MiliQ.

5.4.1 Análisis en muestras ultracongeladas

A pesar de los bajos rendimientos obtenidos en el protocolo 1, técnica fenol-cloroformo mediante digestión con bolas de vidrio, se decidió llevar a cabo una PCR con los oligos diseñados para el gen *linB*. Los resultados de la PCR se muestran en la *Figura 5*.

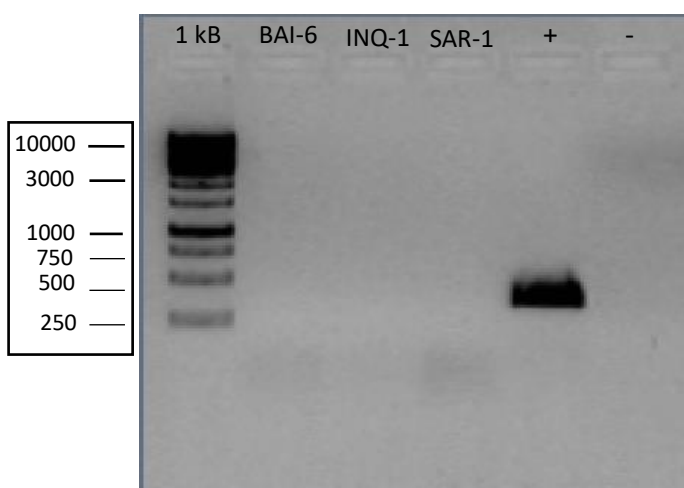


Figura 5. PCR de la extracción de Protocolo 1 con cebadores para el gen *linB*. Carril 1: Patrón de peso molecular 1 KB ThermoFisher®; Carriles 2-4: amplificación del DNA extraído de las muestras BAI-6, INQ-1 y SAR-1; Carril 5: Control positivo-gen *hgptr* de *Anabaena*; Carril 6: Control negativo

Como se puede observar en la figura, no se produjo amplificación de ningún producto para las muestras de DNA microbiano extraído de suelo con los oligos correspondientes al gen *linB*. La no amplificación no parece ser debida a un fallo en la PCR puesto que el control positivo amplifico con éxito.

Aunque las cantidades de DNA obtenidas en el *Protocolo 1* eran muy bajas, , la muestra SAR-1 llegaba a los 50 ng/μL mínimos necesarios para la realización de la PCR de manera correcta, por lo que para esta muestra se esperaba amplificación si hubiera habido presencia del gen *linB* homólogo a los descritos en la búsqueda bibliográfica.

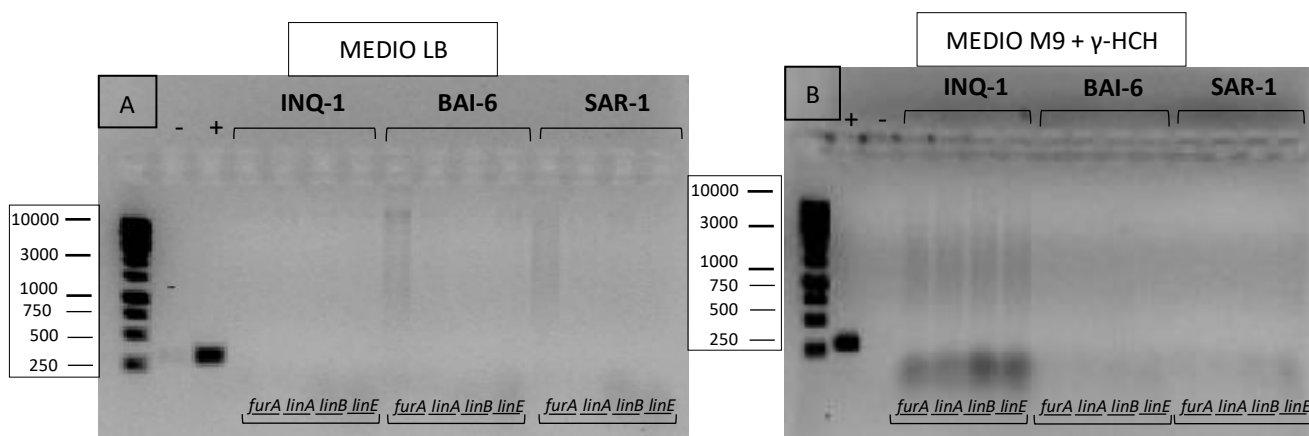
5.4.2 Análisis en muestras enriquecidas.

A partir del DNA de las muestras enriquecidas con medios LB y mínimo M9 suplementado con γ-HCH, obtenidas mediante el *Protocolo 3* de extracción genómica, se procedió a la realización de PCRs para los oligos diseñados para amplificar *linA*, *linB* y *linE*. En este caso además del

control para asegurar el funcionamiento correcto de la PCR y descartar la presencia de géneros bacterianos clave en nuestro estudio, se utilizó otro control para verificar que se producía amplificación a partir del DNA obtenido del suelo, el gen *Fur*.

Este gen participa en la obtención de hierro en el medio, y ha sido ampliamente caracterizado en *Pseudomonas aeruginosa* ⁽²³⁾. Hicimos una comparación entre los genes *furA* de *Pseudomonas* y los de *Sphingobium japonicum* para probar si la homología entre sus secuencias nos podía proporcionar un doble control positivo, para ambos géneros bacterianos. El alineamiento [Anexo 9.7] mostró que efectivamente, había homología entre ellos, y consecuentemente los oligos se utilizaron para descartar, al menos, la presencia de *P. aeruginosa* y *S. japonicum* UT26, los dos organismos modelo de su género en degradación de lindano. Los oligos fueron facilitados por el laboratorio BE3, grupo de Andrés.

Se analizaron los genes *furA*, *linA*, *linB* y *linE*, en ese orden para cada una de las muestras obtenidas (INQ1, BAI-6, SAR-1) por los dos enriquecimientos.



Figuras 6. PCRs realizadas con el DNA extraído de los cultivos enriquecidos de diferentes muestras de suelo contaminado. **Panel A: Medio LB;** Carril 1: marcador de peso molecular (1kb); Carril 2: control negativo; Carril 3: control positivo; Carriles 4-14: amplificación gen *furA*, *linA*, *linB* y *linE* de muestras de tierra indicadas en la figura. **Panel B. Medio M9 + γ-HCH.** Carril 1: marcador de peso molecular (1kb); Carril 2: control positivo; Carril 3: control negativo; Carriles 4-13: amplificación gen *furA*, *linA*, *linB* y *linE* de muestras de tierra indicadas en la figura.

Los resultados de las PCRs para los medios Mínimo (M9) + γ-HCH y LB dieron negativo en todos los casos para las tres muestras.

5.4.3 Estudio de la presencia de genes *lin* en muestras frescas

Ya que no se obtuvo ninguna amplificación en las muestras anteriores se decidió tomar muestras frescas en los lugares de contaminación originales, situados en los alrededores de los vertederos de Bailín y Sardas, y la antigua fábrica de Inquinosa, en Sabiñánigo. Las muestras recogidas frescas fueron también sometidas a enriquecimiento con los medios mínimo y LB [4.2 *Enriquecimiento de poblaciones bacterianas en tierras contaminadas*]. Se extrajo el DNA de las comunidades presentes en los medios mediante el *Protocolo 3* y se procedió a realizar de nuevo las PCRs para los genes *linA*, *linB* y *linE*, además del control *furA* para *P. aeruginosa*. Los resultados se muestran en la *Figura 7*.

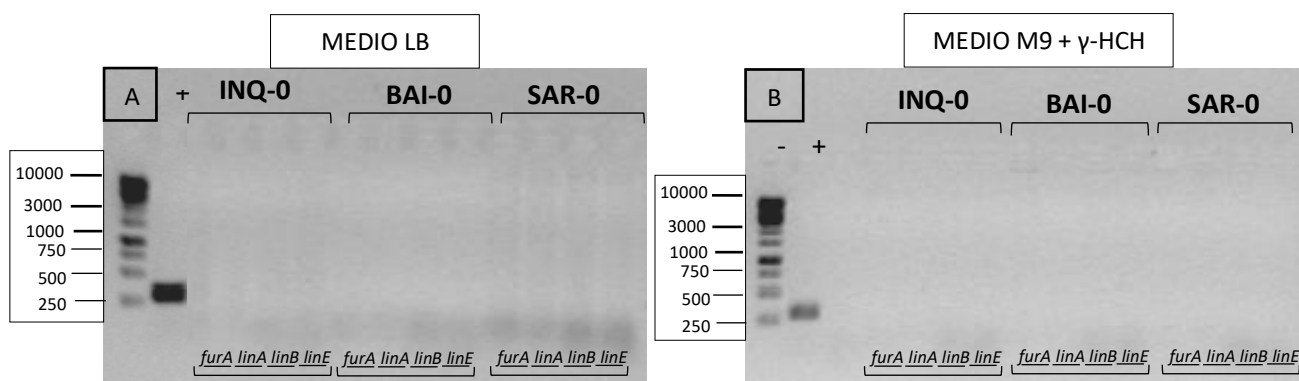


Figura 7. PCRs en gel de agarosa de las muestras de tierra recogidas en fresco. **Panel A. Medio LB** Carril 1: patrón molecular 1Kb; Carril 2: Control positivo; Carriles 3-13: amplificación gen *furA*, *linA*, *linB* y *linE* de muestras de tierra indicadas/ **Panel B. Medio M9 + γ -HCH.** Carril 1: patrón molecular 1Kb; Carril 2: Control positivo; Carril 3: control negativo ; Carriles 3-13: amplificación gen *furA*, *linA*, *linB* y *linE* de muestras de tierra indicadas.

Los resultados de los enriquecimientos de muestras frescas dieron negativo en la amplificación de los genes ensayados de la ruta *lin*, y el gen *furA* de *P. aeruginosa*.

Estos resultados indican que en las poblaciones microbianas tanto frescas como muestreadas y conservadas en el IPE-CSIC no se encontró la presencia de genes con homología a los genes *lin* descritos. Podría explicarse esto por la ausencia de géneros degradadores, porque los oligos diseñados en este trabajo no amplifiquen bien o porque las bacterias estén degradando lindano por diferentes rutas que no fueran la *lin* descrita para Sphingomonaceas aunque esta última parece una opción poco probable. Para descartar un problema en los oligos hubiera sido deseable contar con DNA genómico de alguna bacteria degradadora de lindano, pero en el momento de llevar a cabo este trabajo, no se disponía de ese material.

Según los estudios del IPE-CSIC de los consorcios bacterianos componentes de las comunidades microbianas presentes en los suelos obtenidos, se observaba una actividad degradadora para el isómero γ -HCH presente en las tierras donde habitan estos microbiomas. El resultado de las PCRs sin embargo, nos indica que no hay ninguna presencia de microorganismos degradadores aerobios con la ruta *lin*. La refrigeración de las muestras de tierra durante un periodo de tiempo considerable previo al estudio de estas ha podido ser la causa de que las poblaciones bacterianas se encontraran activas, pero en baja cantidad. Durante este periodo de refrigeración podría haberse dado el desplazamiento de unas poblaciones bacterianas por otras más competentes en las condiciones de almacenamiento, y por tanto que las bacterias que hemos estado estudiando no sean representativas de la población real que había cuando esas muestras fueron cogidas frescas. Sin embargo, en muestras frescas recogidas en puntos próximos a los muestreos originales (variación entre 100-200 metros), no se ha obtenido tampoco amplificación en las PCRs, y, por tanto, podemos constatar, que las poblaciones formadoras de estas muestras no muestran genes homólogos a los de la ruta *lin* estudiada, y que el control con resultado negativo para *furA* de *P. aeruginosa* y *Sphingomonas* descarta la presencia de al menos *Pseudomona* en el cultivo, pero no negaríamos la presencia de *Sphingomonaceas* del todo, al no tener una homología completa entre los genes para los oligos diseñados.

6. DISCUSIÓN GLOBAL

Datos previos del grupo de trabajo del IPE-CSIC, indicaban que, en las muestras utilizadas en este estudio, estaba presente un microbioma capaz de degradar lindano (datos no publicados). En el presente trabajo, en primer lugar, se comprobó la existencia de una población bacteriana en las muestras proporcionadas cuyas funciones metabólicas se encontrarán activas, mediante el estudio con EcoPlates BIOLOG de la utilización de diversas fuentes de carbono. Los datos de los estudios de las capacidades metabólicas medias e individuales para carbohidratos comunes en suelos forestales, revelaron una amplia variedad de capacidades metabólicas por parte de las poblaciones estudiadas. Concretamente, las tomadas en la propia fábrica de Inquinosa mostraron una elevada diversidad metabólica y actividad media. Las procedentes de la balsa de lixiviados de Saldas, a pesar de las elevadas concentraciones de organoclorados presentes en el ambiente, también mostraron una (menor) actividad metabólica, prometedora en la búsqueda de consorcios bacterianos capaces de sobrevivir y degradar en presencia de altas cantidades del isómero γ -HCH.

Se procedió después a la extracción del DNA total de las comunidades microbianas componentes de estos ecosistemas. La puesta a punto del método de extracción requirió un enriquecimiento de las poblaciones presentes en las muestras, activas pero insuficientes para dar rendimientos necesarios para el estudio con PCRs, y la prueba de 3 protocolos diferentes de extracción. Estos enriquecimientos nos permitieron aumentar la densidad microbiana global de la muestra, con medio LB, y la perteneciente a ciertas poblaciones tolerantes/degradadoras de lindano, con medio M9 suplementado con γ -HCH (1/1000).

La selección de los genes *lin* a identificar se llevó a cabo en función de su abundancia en las distintas estirpes, su grado de homología y su relevancia en la ruta de degradación. En cierta forma podrían ser considerados genes marcadores de la presencia de la ruta *lin*. Sin embargo, no se ha obtenido amplificación en ninguno de los casos. Las posibles explicaciones serían que los cebadores fueron inadecuados para hibridar con los genes *lin* de las cepas presentes en esos suelos. Esta explicación implicaría que la homología de secuencia que estos supuestos *lin*, tendría que ser muy baja con respecto a los *lin* presentes en *Sphingomonadaceas*, que son los mejores conocidos y utilizados en este estudio. Sin embargo, es de destacar que microorganismos tan alejados de esta familia como son las cianobacterias han mostrado la presencia de homólogos de *lin* en su genoma, hibridando con cebadores diseñados de forma parecida. Otra posible explicación sería que los microorganismos presentes en estos suelos contaminados degradan el lindano por otra ruta diferente a la que implica al operón *lin*. Finalmente, también podría ocurrir que los microorganismos extraídos de la fracción de suelo y enriquecidos no estuvieran compuestos por los géneros degradadores mayoritarios para los que hemos lanzado este estudio, *Sphingomonaceas* y *Pseudomonas*, vistos los resultados negativos para los controles de gen *furA* que realizamos en las PCRs de muestras de las muestras del estudio y frescas. Este negativo podría deberse a que la fracción de DNA extraído de estas comunidades no fuera representativo con respecto a los géneros que se encontraban en esas muestras cuando fueron obtenidas frescas. Sin embargo, lo que parece es que en las muestras estudiadas no hay presencia de estos microorganismos degradadores.

7. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este estudio, establecemos una serie de conclusiones:

- Las capacidades metabólicas de los microorganismos presentes en los suelos contaminados indican que las bacterias de los suelos INQ-1, SAR-1 y BAI-6 están metabólicamente activas, siendo diferencialmente elevada la actividad de INQ-1 frente al resto.
- La cantidad de bacterias presentes de manera natural en los suelos pertenecientes a Inquinosa (INQ-1), Bailín (BAI-6) y Sardas (SAR-1) contaminados con lindano son insuficientes para obtener niveles aceptables de DNA a partir de ellos.
- Los enriquecimientos en medio LB o M9 con lindano permiten aumentar dichos rendimientos y la extracción de DNA utilizando un método de lisis enzimática ha resultado ser el mejor método para su extracción.
- Las muestras de DNA a partir de los microorganismos presentes en suelos contaminados con lindano utilizados en este estudio no presentaron amplificación para los genes *linA*, *linB*, y *linE* indicativos de la presencia de bacterias degradadoras de lindano.
- Los controles para *furA* de *Sphingomonas* y *Pseudomonas* tampoco amplificaron en las muestras estudiadas, indicativo de que las poblaciones o carecen de la presencia de estos géneros, o la fracción de DNA extraída total no contenía un porcentaje suficiente correspondiente a estos géneros.

CONCLUSIONS

Given the results obtained in this study, we can establish a series of conclusions:

- The metabolic capacities of microorganisms in contaminated soils show that bacteria in INQ-1, SAR-1 and BAI-6 soils are metabolically active, with INQ-1 being the highest registered activities separately from the rest.
- The number of bacteria naturally present in lindane contaminated soils Inquinosa (INQ-1), Bailin (BAI-6) and Sardas (SAR-1) is not enough to obtain acceptable DNA yields out of them.
- Enrichments in LB and M9 medium with lindane allow us to increase DNA extraction yields and using an enzymatic lysis method has been proved to be the best method for these extractions.
- DNA samples from microorganisms present in contaminated soils used in this study did not show amplification for *linA*, *linB* or *linE* genes, which are markers for the presence of lindane degrading bacteria.
- *Sphingomonas* and *Pseudomonas furA* controls neither amplified in the studied samples, indicative that either microbial populations lack of these genres in them, or the total DNA extracted fraction did not have an adequate percentage of this genres.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández J, Arjol MA, Cacho C. POP-contaminated sites from HCH production in Sabiñánigo, Spain. *Environ Sci Pollut Res*. 2013;20(4):1937–50.
2. Vijgen J, Abhilash PC, Li YF, Lal R, Forter M, Torres J, et al. Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs-a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environ Sci Pollut Res*. 2011;18(2):152–62.
3. Gobierno de Aragón. Departamento de Desarrollo Rural y Sostenibilidad. Plan Estratégico de lucha integral contra la contaminación por Lindano y otros isómeros del HCH en Aragón. 2016.
4. Lucini E, Merlo C, Noé LB, Bruno M, Vázquez C, Dubini L, et al. Complemento teórico de microbiología agrícola. Facultad de ciencias agropecuarias. Univ Nac Córdoba.
5. Lal R, Pandey G, Sharma P, Kumari K, Malhotra S, Pandey R, et al. Biochemistry of Microbial Degradation of Hexachlorocyclohexane and Prospects for Bioremediation. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2010;74(1):58–80. Available from: <http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00029-09>
6. Mohn WW, Mertens B, Neufeld JD, Verstraete W, De Lorenzo V. Distribution and phylogeny of hexachlorocyclohexane-degrading bacteria in soils from Spain. *Environ Microbiol*. 2006;8(1):60–8.
7. Manickam N, Mau M, Schlömann M. Characterization of the novel HCH-degrading strain, *Microbacterium* sp. ITRC1. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;69(5):580–8.
8. Kim H, Nishiyama M, Kunito T, Senoo K, Kawahara K, Murakami K, et al. High population of *Sphingomonas* species on plant surface. *J Appl Microbiol*. 1998;85(4):731–6.
9. Raina V, Suar M, Singh A, Prakash O, Dadhwal M, Gupta SK, et al. Enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) in contaminated soils via inoculation with *Sphingobium indicum* B90A. *Biodegradation*. 2008;19(1):27–40.
10. Lodha B, Bhat P, Kumar MS, Vaidya AN, Mudliar S, Killedar DJ, et al. Bioisomerization kinetics of γ -HCH and biokinetics of *Pseudomonas aeruginosa* degrading technical HCH. *Biochem Eng J*. 2007;35(1):12–9.
11. Phillips TM, Seech AG, Lee H, Trevors JT. Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. *Biodegradation*. 2005;16(4):363–92.
12. Lal R, Dogra C, Malhotra S, Sharma P, Pal R. Diversity, distribution and divergence of lin genes in hexachlorocyclohexane-degrading sphingomonads. *Trends Biotechnol*. 2006;24(3):121–30.
13. Nishida H, Oshima T. DNA traffic in the Environment. Springer, Singapore; 2019. 234–240 p.
14. Pearce SL, Oakeshott JG, Pandey G. Insights into ongoing evolution of the hexachlorocyclohexane catabolic pathway from comparative genomics of ten sphingomonadaceae strains. *G3 Genes, Genomes, Genet*. 2015;5(6):1081–94.

15. Muñiz S, Gonzalvo P, Valdehita A, Molina-Molina JM, Navas JM, Olea N, et al. Ecotoxicological assessment of soils polluted with chemical waste from lindane production: Use of bacterial communities and earthworms as bioremediation tools. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2017;145(July):539–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.070>
16. Team Rs. Rstudio: Integrated Development for R. Rstudio, Inc. [Internet]. Boston, MA; 2015. Available from: <http://www.rstudio.com/>.
17. Pino-Otín MR, Muñiz S, Val J, Navarro E. Effects of 18 pharmaceuticals on the physiological diversity of edaphic microorganisms. *Sci Total Environ* [Internet]. 2017;595:441–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.002>
18. Neufeld JD, Mohn WW, De Lorenzo V. Composition of microbial communities in hexachlorocyclohexane (HCH) contaminated soils from Spain revealed with a habitat-specific microarray. *Environ Microbiol*. 2006;8(1):126–40.
19. Endo R, Kamakura M, Miyauchi K, Fukuda M, Ohtsubo Y, Tsuda M, et al. Identification and characterization of genes involved in the downstream degradation pathway of γ -hexachlorocyclohexane in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *J Bacteriol*. 2005;187(3):847–53.
20. Manickam N, Misra R, Mayilraj S. A novel pathway for the biodegradation of γ -hexachlorocyclohexane by a *Xanthomonas* sp. strain ICH12. *J Appl Microbiol*. 2007;102(6):1468–78.
21. Kumar M, Chaudhary P, Dwivedi M, Kumar R, Paul D, Jain RK, et al. Enhanced biodegradation of β - and δ -hexachlorocyclohexane in the presence of α - and α -isomers in contaminated soils. *Environ Sci Technol*. 2005;39(11):4005–11.
22. Guío Martínez J. Degradación de isómeros del hexaclorociclohexano (HCH) por *Anabaena* PCC7120. 2018.
23. Pasqua M, Visaggio D, Lo Sciuto A, Genah S, Banin E, Visca P, et al. Ferric Uptake Regulator Fur is conditionally Essential in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2017;199(22):1–17.
24. Garland JL. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*. 1997;24:43.

9. ANEXOS

9.1 RUTA DEGRADACIÓN DEL LINDANO

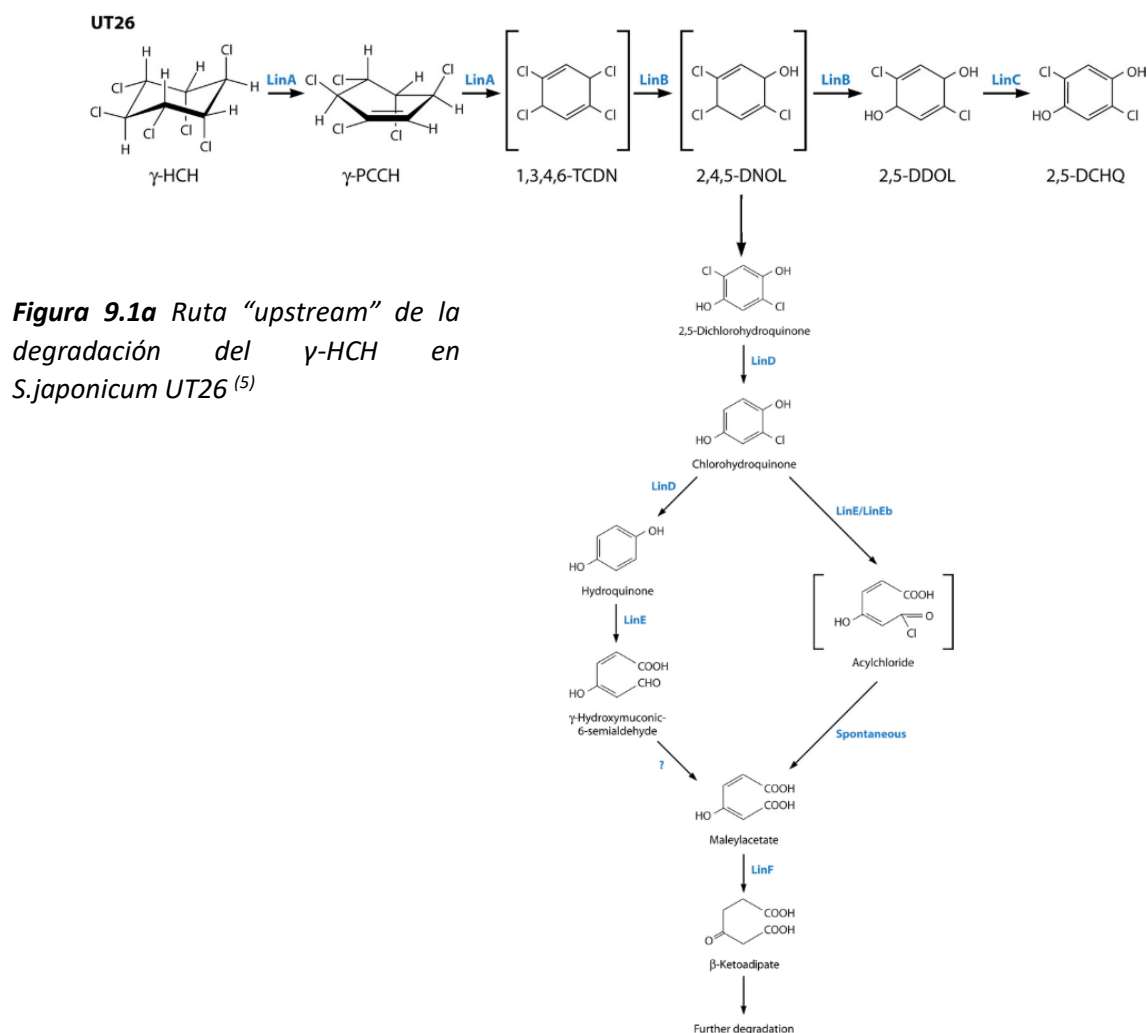


Figura 9.1b Ruta "downstream" de la degradación de γ -HCH en *S.japonicum* ⁽⁵⁾

9.2 RENDIMIENTOS DE LAS EXTRACCIONES DE DNA DE COMUNIDADES MICROBIANAS EN DIFERENTES MUESTRAS

Muestra cultivo	UFC/gr suelo fresco *	DNA extraído (ng/ μ L)	Rendimiento (ug/g suelo)	Pureza	
				Abs 260/280	Abs 260/230
BAI-6	2.31E+05	12.1	0.3025	1.82	0.212
INQ-1	9.23E+04	1.9	0.0475	1.72	0.567
SAR-1	1.15E+07	91.5	2.2875	1.482	0.287

Tabla 9.2.1 Rendimientos de la extracción de DNA de muestras ultracongeladas de cultivos bacterianos obtenidos con la técnica de fenol-cloroformo con digestión mecánica. (Protocolo 1)

*Datos de densidades proporcionados por el grupo de Restauración Ecológica, del departamento de Conservación de la Biodiversidad y Restauración de Ecosistemas IPE, (CSIC).

Muestra tierra	DNA extraído (ng/μL)	Rendimiento (ug/g suelo)	Pureza	
			Abs 260/280	Abs 260/230
INQ-1	5.4	23.76	-	-
BAI-6	6.6	29.04	-	-
SAR-1	3.0	13.2	-	-

Tabla 9.2.2 Rendimientos de la extracción de DNA de comunidades microbianas de muestras de suelo obtenidos con el kit comercial BIOMICS[®]. (Protocolo 2)

Muestra tierra	Enriquecimiento	DNA extraído (ng/μL)	Rendimiento (ug/g suelo)	Pureza	
				Abs 260/280	Abs 260/230
INQ-1	LB	2414	289.68	1.953	2.051
	M9	908.5	54.51	1.759	1.875
BAI-6	LB	2354	282.48	1.776	2.131
	M9	1261.25	75.675	1.713	1.592
SAR-1	LB	1283	153.96	1.617	2.059
	M9	463.5	27.81	1.572	2.011

Tabla 9.2.3 Rendimientos de la extracción de comunidades microbianas procedentes de muestras de suelo utilizando la técnica de fenol-cloroformo con digestión enzimática (Protocolo 3).

9.3 ENSAYOS DE PCR

9.3.1 Composición de mezcla de reacción

Buffer 10x	5 μL
MgCl ₂	1,5 μL
dNTPs	1 μL
Primer 1(20 μM)	2,5 μL
Primer 2 (20 μM)	2,5 μL
H ₂ O MQ	36 μL
DNA polimerasa	2,5 μL
DNA	2 μL

Tabla 9.3.1 Composición de la mezcla de reacción para la PCR

9.3.2 Oligonucleótidos diseñados

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Secuencia amplificada
<i>linAfor</i>	CCGCGATTCAGGACCTC	Gen <i>linA</i> perteneciente a la ruta "upstream" de degradación del lindano
<i>linArev</i>	TTGCGCTTAGAGAACTTCC	
<i>linBfor</i>	CGGCGCATGGCCTATATC	Gen <i>linB</i> perteneciente a la ruta "upstream" de degradación del lindano
<i>linBrev</i>	CGGAATCGGGCTTTTCGC	
<i>linEfor</i>	GGCTCGGCCTGCGGC	Gen <i>linE</i> perteneciente a la ruta "downstream" de degradación del lindano
<i>linErev</i>	GCGGCGCGACCTTGAC	

Tabla 9.3.2 Oligonucleótidos diseñados para la reacción de amplificación por PCR

9.4 TABLA COMPUESTOS BIOLOG ECOPLATES®

ECOPLATES BIOLOG®			
Agua	β-Metil-D glucosido	Ácido D-galactónico γ-Lactona	L-Arginina
Acido metilester pirúvico	D-Xylosa	Ácido D- Galacturónico	L-Asparagina
Tween 40	i-Eritritol	Ácido 2-hidroxi benzoico	L-Fenilalanina
Tween 80	D-Manitol	Ácido 4-hidroxi benzoico	L-Serina
α-ciclodextrina	N-acetil-D- glucosamina	Ácido γ- hidroxibutírico	L-Treonina
Glicogeno	Ácido D- Glucosaminico	Ácido Itaconico	Ácido Glicil L- Glutamico
D-Cellobiosa	Glucosa 1-Fosfato	Ácido α-ketobutírico	Feniletilamina
α-D-Lactosa	D-L-α-glicerolfosfato	Ácido D-Málico	Putrescina
	Carbohidratos	Ácidos Carbónicos	Aminoácidos

9.5 TABLA ESPECIES BACTERIANAS UTILIZADAS EN EL ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE

<i>linB</i>	<i>linE</i>	<i>linA</i>
<i>Microbacteriumsp. ITRC1</i>	<i>Microbacteriumsp. ITRC1</i>	<i>Xanthomonas sp.</i>
<i>Xanthomonas sp.</i>	<i>Sphingobiumsp.</i>	<i>Sphingobiumjaponicum</i>
<i>Sphingomonaspaucimobilis B90</i>	<i>Sphingomonaspaucimobilis B90</i>	<i>Sphingobiumpaucimobilis</i>
<i>Sphingobiumjaponicum</i>	<i>Sphingobiumjaponicum</i>	<i>Sphingobiumfrancese</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa ITRC-5</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa ITRC-5</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa ITRC-5</i>
<i>Sphingobium sp. MI1205</i>	<i>Sphingobium sp. MI1205</i>	<i>Sphingomonas DS3.1</i>
		<i>Sphingomonas Gamma 16-1</i>
		<i>Sphingobiumchinhhatense</i>

Tabla 9.5. Especies bacterianas de las que se consiguieron las secuencias génicas de los genes *linB*, *linE* y *linA*.

GENES LIN

9.6 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

Alineamiento *linA*

SphingomonasAlfa4-2	ATGAGTGATCTAGACAGACTTGCAAGCCGGGCCGCGATTTCAGGACCTCTACTCTGACCAG	60
Sphingobjapon	-----GCCGCGATTTCAGGACCTCTACTCTGACAAG	30
Sphingobchinhhatense	ATGAGTGATCTAGACAGACTTGCAAGCCGGGCCGCGATTTCAGGACCTCTACTCTGACAAG	60
Sphingomonpaucimob	ATGAGTGATCTAGACAGACTTGCAAGCCGGGCCGCGATTTCAGGACCTCTACTCTGACAAG	60
Sphingobfrancense	ATGAGTGATCTAGACAGACTTGCAAGCCGGGCCGCGATTTCAGGACCTCTACTCTGACAAG	60
SphingomonaspGamma16-1	ATGAGTGATCTAGACAGACTTGCAAGCCGGGCCGCGATTTCAGGACCTCTACTCTGACAAG	60
Sphingomonassp.DS3-1	ATGAGTGATCTAGACAGACTTGCAAGCCGGGCCGCGATTTCAGGACCTCTACTCTGACAAG	60
PseudomonaerugiITRC-5	ATGAGTGATCTAGACAGACTTGCAAGCCGGGCCGCGATTTCAGGACCTCTACTCTGACAAG	60
Xanthomonas	-----GCCGCGATTTCAGGACCTCTACTCTGACAAG	31

SpingomonasAlfa4-2	CTCATTGGCGTAGACAAGCGCCAAGAGGGCCGTCTCGCTTCTATTTGGTGGGATGATGCA	120
Spingobjapon	CTCATTGGCGTAGACAAGCGCCAAGAGGGCCGTCTCGCTTCTATTTGGTGGGATGATGCA	90
Spingobchinhatense	CTCATTGGCGTAGACAAGCGCCAAGAGGGCCGTCTCGCTTCTATTTGGTGGGATGATGCA	120
Spingomonpaucimob	CTCATTGGCGTAGACAAGCGCCAAGAGGGCCGTCTCGCTTCTATTTGGTGGGATGATGCA	120
Spingobfrancense	CTCATTGGCGTAGACAAGCGCCAAGAGGGCCGTCTCGCTTCTATTTGGTGGGATGATGCA	120
SpingomonaspGamma16-1	CTCATTGGCGTAGACAAGCGCCAAGAGGGCCGTCTCGCTTCTATTTGGTGGGATGATGCA	120
Spingomonassp.DS3-1	CTCATTGGCGTAGACAAGCGCCAAGAGGGCCGTCTCGCTTCTATTTGGTGGGATGATGCA	120
PseudomonaerugiITRC-5	CTCATTGGCGTAGACAAGCGCCAAGAGGGCCGTCTCGCTTCTATTTGGTGGGATGATGCA	120
Xanthomonas	CTCATTGGCGTAGACAAGCGCCAAGAGGGCCGTCTCGCTTCTATTTGGTGGGATGATGCA	91

SpingomonasAlfa4-2	GAGTGGACCATTGAGGGAATCGGCACCTACAAGGGCCCGGAAGGCGCCCTCGATTTGGCC	180
Spingobjapon	GAGTGGACCATTGAGGGAATCGGCACCTACAAGGGCCCGGAAGGCGCCCTCGATTTGGCC	150
Spingobchinhatense	GAGTGGACCATTGAGGGAATCGGCACCTACAAGGGCCCGGAAGGCGCCCTCGATTTGGCC	180
Spingomonpaucimob	GAGTGGACCATTGAGGGAATCGGCACCTACAAGGGCCCGGAAGGCGCCCTCGATTTGGCC	180
Spingobfrancense	GAGTGGACCATTGAGGGAATCGGCACCTACAAGGGCCCGGAAGGCGCCCTCGATTTGGCC	180
SpingomonaspGamma16-1	GAGTGGACCATTGAGGGAATCGGCACCTACAAGGGCCCGGAAGGCGCCCTCGATTTGGCC	180
Spingomonassp.DS3-1	GAGTGGACCATTGAGGGAATCGGCACCTACAAGGGCCCGGAAGGCGCCCTCGATTTGGCC	180
PseudomonaerugiITRC-5	GAGTGGACCATTGAGGGAATCGGCACCTACAAGGGCCCGGAAGGCGCCCTCGATTTGGCC	180
Xanthomonas	GAGTGGACCATTGAGGGAATCGGCACCTACAAGGGCCCGGAAGGCGCCCTCGATTTGGCC	151

SpingomonasAlfa4-2	AATAACGTACTCTGGCCAATGTATCACGAACTATTTCATTATGGAACCAATCTGCGCTTG	240
Spingobjapon	AATAACGTACTCTGGCCAATGTATCACGAACTATTTCATTATGGAACCAATCTGCGCTTG	210
Spingobchinhatense	AATAACGTACTCTGGCCAATGTATCACGAACTATTTCATTATGGAACCAATCTGCGCTTG	240
Spingomonpaucimob	AATAACGTACTCTGGCCAATGTATCACGAACTATTTCATTATGGAACCAATCTGCGCTTG	240
Spingobfrancense	AATAACGTACTCTGGCCAATGTATCACGAACTATTTCATTATGGAACCAATCTGCGCTTG	240
SpingomonaspGamma16-1	AATAACGTACTCTGGCCAATGTATCACGAACTATTTCATTATGGAACCAATCTGCGCTTG	240
Spingomonassp.DS3-1	AATAACGTACTCTGGCCAATGTATCACGAACTATTTCATTATGGAACCAATCTGCGCTTG	240
PseudomonaerugiITRC-5	AATAACGTACTCTGGCCAATGTATCACGAACTATTTCATTATGGAACCAATCTGCGCTTG	240
Xanthomonas	AATAACGTACTCTGGCCAATGTATCACGAACTATTTCATTATGGAACCAATCTGCGCTTG	211

SpingomonasAlfa4-2	GAATTTGTGAGCGCGGACAAGGTAATGGTATTGGCGACGTCCTTTGCCTTGGAATCTC	300
Spingobjapon	GAATTTGTGAGCGCGGACAAGGTAATGGTATTGGCGACGTCCTTTGCCTTGGAATCTC	257
Spingobchinhatense	GAATTTGTGAGCGCGGACAAGGTAATGGTATTGGCGACGTCCTTTGCCTTGGAATCTC	300
Spingomonpaucimob	GAATTTGTGAGCGCGGACAAGGTAATGGTATTGGCGACGTCCTTTGCCTTGGAATCTC	300
Spingobfrancense	GAATTTGTGAGCGCGGACAAGGTAATGGTATTGGCGACGTCCTTTGCCTTGGAATCTC	300
SpingomonaspGamma16-1	GAATTTGTGAGCGCGGACAAGGTAATGGTATTGGCGACGTCCTTTGCCTTGGAATCTC	300
Spingomonassp.DS3-1	GAATTTGTGAGCGCGGACAAGGTAATGGTATTGGCGACGTCCTTTGCCTTGGAATCTC	300
PseudomonaerugiITRC-5	GAATTTGTGAGCGCGGACAAGGTAATGGTATTGGCGACGTCCTTTGCCTTGGAATCTC	300
Xanthomonas	GAATTTGTGAGCGCGGACAAGGTAATGGTATTGGCGACGTCCTTTGCCTTGGAATCTC	271

SpingomonasAlfa4-2	GTCTGAAGGTAATCAGTCGATTCTTATCGCTGCGGTCTACACGAATGAGTATGAGCGCCGT	360
Spingobjapon	GTCTGAAGGTAATCAGTCGATTCTTATCGCTGCGGTCTTACCGATGAGTATGAGCGCCGT	270
Spingobchinhatense	GTCTGAAGGTAATCAGTCGATTCTTATCGCTGCGGTCTTACCGATGAGTATGAGCGCCGT	360
Spingomonpaucimob	GTCTGAAGGTAATCAGTCGATTCTTATCGCTGCGGTCTTACCGATGAGTATGAGCGCCGT	360
Spingobfrancense	GTCTGAAGGTAATCAGTCGATTCTTATCGCTGCGGTCTTACCGATGAGTATGAGCGCCGT	360
SpingomonaspGamma16-1	GTCTGAAGGTAATCAGTCGATTCTTATCGCTGCGGTCTTACCGATGAGTATGAGCGCCGT	360
Spingomonassp.DS3-1	GTCTGAAGGTAATCAGTCGATTCTTATCGCTGCGGTCTTACCGATGAGTATGAGCGCCGT	360
PseudomonaerugiITRC-5	GTCTGAAGGTAATCAGTCGATTCTTATCGCTGCGGTCTTACCGATGAGTATGAGCGCCGT	360
Xanthomonas	GTCTGAAGGTAATCAGTCGATTCTTATCGCTGCGGTCTTACCGATGAGTATGAGCGCCGT	331

SpingomonasAlfa4-2	GACGGGGTGTGGAAGTCTCTAAGCTCAACGCATGCATGAACATTTTACCCCGCTGGCC	420
Spingobjapon	GACGGGGTGTGGAAGTCTCTAAGCTCAACGCATGCATGAACATTTTACCCCGCTGGCC	308
Spingobchinhatense	GACGGGGTGTGGAAGTCTCTAAGCTCAACGCATGCATGAACATTTTACCCCGCTGGCC	420
Spingomonpaucimob	GACGGGGTGTGGAAGTCTCTAAGCTCAACGCATGCATGAACATTTTACCCCGCTGGCC	420
Spingobfrancense	GACGGGGTGTGGAAGTCTCTAAGCTCAACGCATGCATGAACATTTTACCCCGCTGGCC	420
SpingomonaspGamma16-1	GACGGGGTGTGGAAGTCTCTAAGCTCAACGCATGCATGAACATTTTACCCCGCTGGCC	420
Spingomonassp.DS3-1	GACGGGGTGTGGAAGTCTCTAAGCTCAACGCATGCATGAACATTTTACCCCGCTGGCC	420
PseudomonaerugiITRC-5	GACGGGGTGTGGAAGTCTCTAAGCTCAACGCATGCATGAACATTTTACCCCGCTGGCC	420
Xanthomonas	GACGGGGTGTGGAAGTCTCTAAGCTCAACGCATGCATGAACATTTTACCCCGCTGGCC	391

SpingomonasAlfa4-2	GGCATTCAATTTCGCACCGCCCGGGCTCTGTTGCAAAAATCGTGA-----	465
Spingobjapon	GGCATTCAATTTCGCACCGCCCGGGCTCTGTTGCAAAAATCGTGA-----	308
Spingobchinhatense	GGCATTCAATTTCGCACCGCCCGGGCTCTGTTGCAAAAATCGTGA-----	471
Spingomonpaucimob	GGCATTCAATTTCGCACCGCCCGGGCTCTGTTGCAAAAATCGTGA-----	471
Spingobfrancense	GGCATTCAATTTCGCACCGCCCGGGCTCTGTTGCAAAAATCGTGA-----	471
SpingomonaspGamma16-1	GGCATTCAATTTCGCACCGCCCGGGCTCTGTTGCAAAAATCGTGA-----	471
Spingomonassp.DS3-1	GGCATTCAATTTCGCACCGCCCGGGCTCTGTTGCAAAAATCGTGA-----	465
PseudomonaerugiITRC-5	GGCATTCAATTTCGCACCGCCCGGGCTCTGTTGCAAAAATCGTGA-----	480
Xanthomonas	GGCATTCAATTTCGCACCG-----	409

SpingomonasAlfa4-2	-----	465
Spingobjapon	-----	308
Spingobchinhatense	-----	471
Spingomonpaucimob	-----	471
Spingobfrancense	-----	471
SpingomonaspGamma16-1	-----	471
Spingomonassp.DS3-1	-----	465
PseudomonaerugiITRC-5	-----	465
Xanthomonas	GTTGCAAAAATCGTGA	496

Alineamiento *linB*

Microbacteriumsp.	GAATTCGATGAGCC-TCGGCCAAAGCCATTGGCGAGAAGAAATTCATTGAGATCAAGG	59
Xanthomonassp.	-----ATGATCCTCGGCGCAAACGCATTGGCGAGAAGAAATTCATTGAGATT-AAG	51
Sphingobjaponicum	-----ATGAGCCTCGGCGCAAAGCCATTGGCGAGAAGAAATTCATTGAGATC-AAG	51
SphingomPau90	-----ATGAGCCTCGGCGCAAAGCCATTGGCGAGAAGAAATTCATTGAGATC-AAG	51
MI1205Sphingobium	-----ATGAGCCTCGGCGCAAAGCCATTGGCGAGAAGAAATTCATTGAGATC-AAG	51
PseudoAeurig	-----ATGAGCCTCGGCGCAAAGCCATTGGCGAGAAGAAATTCATTGAGATC-AAG ***** * * *****	51
Microbacteriumsp.	GGGCGGCGCATGGCCTATATCGATGAAGGGACCGGCGATCCGATCCTCTTCAAGCACGGC	119
Xanthomonassp.	GGCGGCGCATGGCCTATATCGATGAAGGGACCGGCGATCCGATCCTCTTCCAGCACGGC	111
Sphingobjaponicum	GGCGGCGCATGGCCTATATCGATGAAGGGACCGGCGATCCGATCCTCTTCCAGCACGGC	111
SphingomPau90	GGCGGCGCATGGCCTATATCGATGAAGGGACCGGCGATCCGATCCTCTTCCAGCACGGC	111
MI1205Sphingobium	GGCGGCGCATGGCCTATATCGATGAAGGGACCGGCGATCCGATCCTCTTCCAGCACGGC	111
PseudoAeurig	GGCGGCGCATGGCCTATATCGATGAAGGGACCGGCGATCCGATCCTCTTCCAGCACGGC ** *****	111
Microbacteriumsp.	AATCCGAACGTCGTCGATCTGTGGCGCAATATCATGCCGCATTGCGCCGGGCTGGGA-C	178
Xanthomonassp.	AATCCG-ACGTCGTCCTATCTGTGGCGCAATATCATGCCGCATTGCGCCGGGCTGGGACG	170
Sphingobjaponicum	AATCCG-ACGTCGTCCTATCTGTGGCGCAATATCATGCCGCATTGCGCCGGGCTGGGACG	170
SphingomPau90	AATCCG-ACGTCGTCCTATCTGTGGCGCAATATCATGCCGCATTGCGCCGGGCTGGGACG	170
MI1205Sphingobium	AATCCG-ACGTCGTCCTATCTGTGGCGCAATATCATGCCGCATTGCGCCGGGCTGGGACG	170
PseudoAeurig	AATCCG-ACGTCGTCCTATCTGTGGCGCAATATCATGCCGCATTGCGCCGGGCTGGGACG ***** *****	170
Microbacteriumsp.	GGTGATCGCCTGTGACCTGATCGGCATGGGCGATTCCGACAAGCTCGATCCGTGCGGGGCC	238
Xanthomonassp.	GCTGATCGCCTGTGACCTGATCGGCATGGGCGATTCCGACAAGCTCGATCCGTGCGGGGCC	230
Sphingobjaponicum	GCTGATCGCCTGTGACCTGATCGGCATGGGCGATTCCGACAAGCTCGATCCGTGCGGGGCC	230
SphingomPau90	GCTGATCGCCTGTGACCTGATCGGCATGGGCGATTCCGACAAGCTCGATCCGTGCGGGGCC	230
MI1205Sphingobium	GCTGATCGCCTGTGACCTGATCGGCATGGGCGATTCCGACAAGCTCGATCCGTGCGGGGCC	230
PseudoAeurig	GCTGATCGCCTGTGACCTGATCGGCATGGGCGATTCCGACAAGCTCGATCCGTGCGGGGCC * *****	230
Microbacteriumsp.	CGAGCGTTATGCCATATGCCGAGCATCGTGACTATCTCGACCGCGCTGTGGGAGGCGCTCG	298
Xanthomonassp.	CGAGCGTTATGCCATATGCCGAGCATCGTGACTATCTCGAC-GCGCTGTGGGAGGCGCTCG	289
Sphingobjaponicum	CGAGCGTTATGCCATATGCCGAGCATCGTGACTATCTCGAC-GCGCTGTGGGAGGCGCTCG	289
SphingomPau90	CGAGCGTTATGCCATATGCCGAGCATCGTGACTATCTCGAC-GCGCTGTGGGAGGCGCTCG	289
MI1205Sphingobium	CGAGCGTTATGCCATATGCCGAGCATCGTGACTATCTCGAC-GCGCTGTGGGAGGCGCTCG	289
PseudoAeurig	CGAGCGTTATGCCATATGCCGAGCATCGTGACTATCTCGAC-GCGCTGTGGGAGGCGCTCG ***** *****	289
Microbacteriumsp.	ATCTCGGGGACAGGGTTGTTCTGTGTCGATGACTGGGGG---TCCTCGGCTTCGACT	354
Xanthomonassp.	ATCTCGGGGACAGGGTTGTTCTGTGTCGATGACTGGGGGTCCGTCTCGGCTTCGACT	349
Sphingobjaponicum	ATCTCGGGGACAGGGTTGTTCTGTGTCGATGACTGGGGGTCCGCCCTCGGCTTCGACT	349
SphingomPau90	ATCTCGGGGACAGGGTTGTTCTGTGTCGATGACTGGGGGTCCGTCTCGGCTTCGACT	349
MI1205Sphingobium	ATCTCGGGGACAGGGTTGTTCTGTGTCGATGACTGGGGGTCCGTCTCGGCTTCGACT	349
PseudoAeurig	ATCTCGGGGACAGGGTTGTTCTGTGTCGATGACTGGGGGTCCGTCTCGGCTTCGACT ***** *****	349
Microbacteriumsp.	GGGCCCCGCCCCACCGCGAGCGGTACAGGGGATTGCCTATATGGAAGCGATCGCCATGC	414
Xanthomonassp.	GGGCCCCGCCCCACCGCGAGCGGTACAGGGGATTGCCTATATGGAAGCGGTACCATATGC	409
Sphingobjaponicum	GGGCCCCGCCCCACCGCGAGCGGTACAGGGGATTGCCTATATGGAAGCGATCGCCATGC	409
SphingomPau90	GGGCCCCGCCCCACCGCGAGCGGTACAGGGGATTGCCTATATGGAAGCGGTACCATATGC	409
MI1205Sphingobium	GGGCCCCGCCCCACCGCGAGCGGTACAGGGGATTGCCTATATGGAAGCGGTACCATATGC	409
PseudoAeurig	GGGCCCCGCCCCACCGCGAGCGGTACAGGGGATTGCCTATATGGAAGCGGTACCATATGC ***** ** *****	409
Microbacteriumsp.	CGATCGAATGGGCGGATTTTCCCGAACAGGATCGCGATCTGTTTCAGGCCTTTCGCTCGC	474
Xanthomonassp.	CGTCTGAATGGGCGGATTTTCCCGAACAGTATCGCGATATGTTTCAGGCCTTTCGCTCGC	469
Sphingobjaponicum	CGATCGAATGGGCGGATTTTCCCGAACAGGATCGCGATCTGTTTCAGGCCTTTCGCTCGC	469
SphingomPau90	CGTCTGAATGGGCGGATTTTCCCGAACAGGATCGCGATCTGTTTCAGGCCTTTCGCTCGC	469
MI1205Sphingobium	CGTCTGAATGGGCGGATTTTCCCGAACAGGATCGCGATCTGTTTCAGGCCTTTCGCTCGC	469
PseudoAeurig	CGTCTGAATGGGCGGATTTTCCCGAACAGGATCGCGATCTGTTTCAGGCCTTTCGCTCGC ** *****	469
Microbacteriumsp.	AGGCAGGCGAAGAATTGGTGTGTCAG-ACAATGTTTTTGTGCAACAAGTTCTCCCCGGAT	533
Xanthomonassp.	AGGCGGGCGAAGAATTGGTGTGTCAGGACAATGTTTTGTGCAACAAGTTCTCCCCGGAT	529
Sphingobjaponicum	AGGCGGGCGAAGAATTGGTGTGTCAGGACAATGTTTTGTGCAACAAGTTCTCCCCGGAT	529
SphingomPau90	AGGCGGGCGAAGAATTGGTGTGTCAGGACAATGTTTTGTGCAACAAGTTCTCCCCGGAT	529
MI1205Sphingobium	AGGCGGGCGAAGAATTGGTGTGTCAGGACAATGTTTTGTGCAACAAGTTCTCCCCGGAT	529
PseudoAeurig	AGGCGGGCGAAGAATTGGTGTGTCAGGACAATGTTTTGTGCAACAAGTTCTCCCCGGAT **** *****	529
Microbacteriumsp.	TGATCCTGCGCCCCCTTAAGCGAAGCGGAGATGGCCGCCTATCGCGAGCCCTTCCTCTCCG	593
Xanthomonassp.	TGATCCTGCGCCCCCTTAAGCGAAGCGGAGATGGCCGCCTATCGCGAGCCCTTCCTCGCCG	589
Sphingobjaponicum	TGATCCTGCGCCCCCTTAAGCGAAGCGGAGATGGCCGCCTATCGCGAGCCCTTCCTCGCCG	589
SphingomPau90	TGATCCTGCGCCCCCTTAAGCGAAGCGGAGATGGCCGCCTATCGCGAGCCCTTCCTCGCCG	589
MI1205Sphingobium	TGATCCTGCGCCCCCTTAAGCGAAGCGGAGATGGCCGCCTATCGCGAGCCCTTCCTCGCCG	589
PseudoAeurig	TGATCCTGCGCCCCCTTAAGCGAAGCGGAGATGGCCGCCTATCGCGAGCCCTTCCTCGCCG ***** **	589
Microbacteriumsp.	CCGGCGAAGCCCGTCGACCGACCTGTCTTG-CCTCGCCAAATCCCGATCGCAGGCACCC	652
Xanthomonassp.	CCGGCGAAGCCCGTCGACCGACCTGTCTTGCCCTCGCCAAATCCCGATCGCAGGCACCC	649

Spingobjaponicum	CCGGCGAAGCCCGTCGACCGACCCCTGTCTTGGCCTCGCCAAATCCCGATCGCAGGCACCC	649
SphingomPau90	CCGGCGAAGCCCGTCGACCGACCCCTGTCTTGGCCTCGCCAAATCCCGATCGCAGGCACCC	649
MI1205Sphingobium	CCGGCGAAGCCCGTCGACCGACCCCTGTCTTGGCCTCGCCAAATCCCGATCGCAGGCACCC	649
PseudoAeurig	CCGGCGAAGCCCGTCGACCGACCCCTGTCTTGGCCTCGCCAAATCCCGATCGCAGGCACCC	649
***** * *****		
Microbacteriumsp.	CGGCCGACGTGGTCGCGATCGCCCGGGACTATGCCGGCTGGCTCAGCGAAAGCCCGATTTC	712
Xanthomonassp.	CGGCCGACGTGGTCGTCACGCCCGGGACTATGCCGGCTGGCTCAGCGAAAGCCCGATTTC	709
Spingobjaponicum	CGGCCGACGTGGTCGCGATCGCCCGGGACTATGCCGGCTGGCTCAGCGAAAGCCCGATTTC	709
SphingomPau90	CGGCCGACGTGGTCGCGATCGCCCGGGACTATGCCGGCTGGCTCAGCGAAAGCCCGATTTC	709
MI1205Sphingobium	CGGCCGACGTGGTCGCGATCGCCCGGGACTATGCCGGCTGGCTCAGCGAAAGCCCGATTTC	709
PseudoAeurig	CGGCCGACGTGGTCGCGATCGCCCGGGACTATGCCGGCTGGCTCAGCGAAAGCCCGATTTC	709
***** * *****		
Microbacteriumsp.	CGAAACTCTTCATCAACGCCGAGCCGGG-----	742
Xanthomonassp.	CGAAACTCTTCATCAACGCCGAGCCGGGAGCCCTGACCACGGGCCGAATGCGCGACTTCT	769
Spingobjaponicum	CGAAACTCTTCATCAACGCCGAGCCGGGAGCCCTGACCACGGGCCGAATGCGCGACTTCT	769
SphingomPau90	CGAAACTCTTCATCAACGCCGAGCCGGGAGCCCTGACCACGGGCCGAATACGCGACTTCT	769
MI1205Sphingobium	CGAAACTCTTCATCAACGCCGAGCCGGGAGCCCTGACCACGGGCCGAATACGCGACTTCT	769
PseudoAeurig	CGAAACTCTTCATCAACGCCGAGCCGGGAGCCCTGACCACGGGCCGAATACGCGACTTCT	769
***** * * * *		
Microbacteriumsp.	-----	742
Xanthomonassp.	GCCGCACATGGCCAAACCAGACCGAAATCACGGTCGCGAGCGCCATTTCATCCAGGAGG	829
Spingobjaponicum	GCCGCACATGGCCAAACCAGACCGAAATCACGGTCGCGAGCGCCATTTCATCCAGGAGG	829
SphingomPau90	GCCGCACATGGCCAAACCAGACCGAAATCACGGTCGCGAGCGCCATTTCATCCAGGAGG	829
MI1205Sphingobium	GCCGCACATGGCCAAACCAGACCGAAATCACGGTCGCGAGCGCCATTTCATCCAGGAGG	829
PseudoAeurig	GCCGCACATGGCCAAACCAGACCGAAATCACGGTCGCGAGCGCCATTTCATCCAGGAGG	829
Microbacteriumsp.	-----	742
Xanthomonassp.	ACAGTCCGGACGAGATTGGCGCGCGATTGCGCGGTTTGTCCGCGA-----	876
Spingobjaponicum	ACAGTCCGGACGAGATTGGCGCGCGATTGCGCGGTTTGTCCGCGATTGCGCCAGCAT	889
SphingomPau90	ACAGTCCGGACGAGATTGGCGCGCGATTGCGCGGTTTGTCCGCGATTGCGCCAGCAT	889
MI1205Sphingobium	ACAGTCCGGACGAGATTGGCGCGCGATTGCGCGGTTTGTCCGCGATTGCGCCAGCAT	889
PseudoAeurig	ACAGTCCGGACGAGATTGGCGCGCGATTGCGCGGTTTGTCCGCGATTGCGCCAGCAT	889
Microbacteriumsp.	--	742
Xanthomonassp.	--	876
Spingobjaponicum	AA	891
SphingomPau90	AA	891
MI1205Sphingobium	AA	891
PseudoAeurig	AA	891

Alineamiento *linE*

Microbacterium	-----ATGAATGTCGCACCTCGGGACTGCACCAGTCACCGGCTCGCGGTGAC	51
Pseudomonaputida	-----ATGTCAACCATAAAAGGCTTTCACCATCTGACTGTCGGCGTCGCCGGA	48
Sphingobium	ATGATGCAACTGCCCGAACGCGTCGAAGGACTTCATCACATCACCGTCGCGACCCGATCC	60
Pseudomoaerugi ITRC-5	ATGATGCAACTGCCCGAACGCGTCGAAGGACTTCATCACATCACCGTCGCGACCCGATCC	60
Sphingobjaponi	ATGATGCAACTGCCCGAACGCGTCGAAGGACTTCATCACATCACCGTCGCGACCCGATCC	60
Sphingomonpaucimobilis	ATGATGCAACTGCCCGAACGCGTCGAAGGACTTCATCACATCACCGTCGCGACCCGATCC	60
* * * * *		
Microbacterium	CCGCAGAAGAACATCGACTTCTACGTCCGTGGGCTCGGCCTGGTGAAGAAGACG	111
Pseudomonaputida	GCGCAGGAGGATGTTGACTTCTACGTGAAGTTGCTGGGCCAGAGCCTGATCAAGAAGACG	108
Sphingobium	GCGCAAGGCGACGTGGATCTTCTCGTCAAGACGCTGGGACAGCGGCTCGTCAAGAAGACG	120
Pseudomoaerugi ITRC-5	GCGCAAGGCGACGTGGATCTTCTCGTCAAGACGCTGGGACAGTGGCTCGTCAAGAAGACG	120
Sphingobjaponi	GCGCAAGGCGACGTGGATCTTCTCGTCAAGACGCTGGGACAGCGGCTCGTCAAGAAGACG	120
Sphingomonpaucimobilis	GCGCAAGGCGACGTGGATCTTCTCGTCAAGACGCTGGGACAGCGGCTCGTCAAGAAGACG	120
* * * * *		
Microbacterium	GTCAACTTCGACGACCCCGGCACGT---ACCACCTCTACTACGGCAGCAGTCCGGACGT	168
Pseudomonaputida	GTTCCTGCTTGACGGTGACGAACCATCTACCATTTGTATTACGGCACTCCCGAGGGGAT	168
Sphingobium	ATGTTCTACGACGGCGCACGGCCGGTCTATCATCTGTATTTTCGGCAATGAGCTTGGCGAA	180
Pseudomoaerugi ITRC-5	ATGTTCTACGACGGCGCACGGCCGGTCTATCATCTGTATTTTCGGCAATGAGCTTGGCGAA	180
Sphingobjaponi	ATGTTCTACGACGGCGCACGGCCGGTCTATCATCTGTATTTTCGGCAATGAGCTTGGCGAA	180
Sphingomonpaucimobilis	ATGTTCTACGACGGCGCACGGCCGGTCTATCATCTGTATTTTCGGCAATGAGCTTGGCGAA	180
* * * * *		
Microbacterium	CCCGGCAGCCTCATGACCTTCTTCCCGTGGCGGAACATCGCCCC---CGGGCGCATCGGC	225
Pseudomonaputida	GTGGGTACGCTTGTATACCTTTCCCGTTCAAGCAAAGAGGCGTGAAAGCTCGCCCGGGT	228
Sphingobium	CCGGGCACGCTGTACACCACTTTCCCGTTTCGCCAGGCTGGCTACACCGGAAAGCGTGGT	240
Pseudomoaerugi ITRC-5	CCGGGCACGCTGTACACCACTTTCCCGTTTCGCCAGGCTGGCTACACCGGAAAGCGTGGT	240
Sphingobjaponi	CCGGGCACGCTGTACACCACTTTCCCGTTTCGCCAGGCTGGCTACACCGGAAAGCGTGGT	240
Sphingomonpaucimobilis	CCGGGCACGCTGTACACCACTTTCCCGTTTCGCCAGGCTGGCTACACCGGAAAGCGTGGT	240
* * * * *		
Microbacterium	GCCGGACAGTCGACCTCGACCGCATTACGGCTCCCGGCCGGATCCCTCGGCTGGTGGCAC	285
Pseudomonaputida	TCTGGCCAGATCAGGGTCATCAACTACTCAGTTCCTCCCAAGCACTCCCTGGATTCTGGCGG	288
Sphingobium	GCAGGGCAGATATCGGCGTTTCTTATAACGCACCCGTCGGTACGCTTTCTGGTGGCAC	300

Pseudomoaerugi ITRC-5	GCAGGGCAGATATCGGCGGTTTCTTATAACGCACCCGTCGGTACGCTTTCTGGTGGCAG	300
Sphingobijaponi	GCAGGGCAGATATCGGCGGTTTCTTATAACGCACCCGTCGGTACGCTTTCTGGTGGCAG	300
Sphingomonpaucimobilis	GCAGGGCAGATATCGGCGGTTTCTTATAACGCACCCGTCGGTACGCTTTCTGGTGGCAG * * * * *	300
Microbacterium	GAGCACTTCAGCTCGCTCGGCGCAGAGCCGCGCATCACCTCGCCCTCCAGC---AGCGAG	342
Pseudomonaputida	GCTCGCTTCGCCATCAAAGGCGTCCCGTTTCGACCGTGAAGTGGTGTCCGCTTTCGGCGAA	348
Sphingobium	GAGC---ATCTCATAAAGCGCGCTGTGACCGCTCTCGGAAGTGCCTGAGCGGTTTCGGGCAG	357
Pseudomoaerugi ITRC-5	GAGC---ATCTCATAAAGCGCGCTGTGACCGCTCTCGGAAGTGCCTGAGCGGTTTCGGGCAG	357
Sphingobijaponi	GAGC---ATCTCATAAAGCGCGCTGTGACCGCTCTCGGAAGTGCCTGAGCGGTTTCGGGCAG	357
Sphingomonpaucimobilis	GAGC---ATCTCATAAAGCGCGCTGTGACCGCTCTCGGAAGTGCCTGAGCGGTTTCGGGCAG * * * * *	357
Microbacterium	GAGCGCTCTGGTTCGCCGAC---CCGACGGTCTGCGCATCGAGCTTGT-----CGCG	393
Pseudomonaputida	ACGCGCCAGCGTTTTCAGCAT---CGTGCGGGATCGAGTTCGATCTCGTGGCCACTGAT	405
Sphingobium	AAATATCTGTCTGTCGAGCACCCTGACTGCGGTGTTCGGCTTCGAAATCAT-----CGAG	411
Pseudomoaerugi ITRC-5	AAATATCTGTCTGTCGAGCACCCTGACTGCGGTGTTCGGCTTCGAAATCAT-----CGAG	411
Sphingobijaponi	AAATATCTGTCTGTCGAGCACCCTGACTGCGGTGTTCGGCTTCGAAATCAT-----CGAG	411
Sphingomonpaucimobilis	AAATATCTGTCTGTCGAGCACCCTGACTGCGGTGTTCGGCTTCGAAATCAT-----CGAG * * * * *	411
Microbacterium	ACGAACACCGACGACCCGCGGGATCCGTTGGGACTCCGCAAGCGTTCCGGCGGAGTACGCC	453
Pseudomonaputida	CAGGACACGCGCCAGCGTGCG-----TCGCCAGTGATATCCAGAAGAGTTCGCC	456
Sphingobium	CAGGACACGGACGGCCAGTTCGAGCCCTGGGACTCTCCCTATGTGCCCAAGGAGGTTCGCG	471
Pseudomoaerugi ITRC-5	CAGGACACGGACGGCCAGTTCGAGCCCTGGGACTCTCCCTATGTGCCCAAGGAGGTTCGCG	471
Sphingobijaponi	CAGGACACGGACGGCCAGTTCGAGCCCTGGGACTCTCCCTATGTGCCCAAGGAGGTTCGCG	471
Sphingomonpaucimobilis	CAGGACACGGACGGCCAGTTCGAGCCCTGGGACTCTCCCTATGTGCCCAAGGAGGTTCGCG * * * * *	471
Microbacterium	GTGCGCGGGCAGCACTCCAGCGTCTCACGGTGCCTGACCCGAGGGTACCGTCGGGCTT	513
Pseudomonaputida	ATCCGCGCGGTGCACAGCATCACGCTGTCTGCGTGCAGAGTGGCTGAATCAATCATTTTT	516
Sphingobium	CTGCGGGGCTTTCACAGCTGGACGGCCACCCCTAAATCGCAATGAGGAGATGGACTCCTTC	531
Pseudomoaerugi ITRC-5	CTGCGGGGCTTTCACAGCTGGACGGCCACCCCTAAATCGCAATGAGGAGATGGACTCCTTC	531
Sphingobijaponi	CTGCGGGGCTTTCACAGCTGGACGGCCACCCCTAAATCGCAATGAGGAGATGGACTCCTTC	531
Sphingomonpaucimobilis	CTGCGGGGCTTTCACAGCTGGACGGCCACCCCTAAATCGCAATGAGGAGATGGACTCCTTC * * * * *	531
Microbacterium	CTTGTCACCAATCTCGGCATGCGTGTGGTTGAGCAGGCGGCAACCGCACCCGCTCGCC	573
Pseudomonaputida	ATGAAGGACGCTCTTGATTCGCCATCGCAGCTGAAAAATGGCCCTTACCACCGCTTTGAA	576
Sphingobium	ATGCGCAATGCCTGGAACCTGAAGCCCGAGGACGCGACGGCAATTACCAGCGCTACGCT	591
Pseudomoaerugi ITRC-5	ATGCGCAATGCCTGGAACCTGAAGCCCGAGGACGCGACGGCAATTACCAGCGCTACGCT	591
Sphingobijaponi	ATGCGCAATGCCTGGAACCTGAAGCCCGAGGACGCGACGGCAATTACCAGCGCTACGCT	591
Sphingomonpaucimobilis	ATGCGCAATGCCTGGAACCTGAAGCCCGAGGACGCGACGGCAATTACCAGCGCTACGCT * * * * *	591
Microbacterium	GCGGGCGACGGCCTTCCCGCGCCATCGTCGACGTCTGACGCTCCGCCC-----TCACC	627
Pseudomonaputida	ACAGCCAGTGGCGCACCGGGAACGATCGTCGAATTCTGCATGAACCCGATCGCCTGCAA	636
Sphingobium	TTCCGCAATGGCGGTGCGGCCAAGGTGCTAGACGCTCTATATCGATGAGGACGAAAGGCC	651
Pseudomoaerugi ITRC-5	TTCCGCAATGGCGGTGCGGCCAAGGTGCTAGACGCTCTATATCGATGAGGACGAAAGGCC	651
Sphingobijaponi	TTCCGCAATGGCGGTGCGGCCAAGGTGCTAGACGCTCTATATCGATGAGGACGAAAGGCC	651
Sphingomonpaucimobilis	TTCCGCAATGGCGGTGCGGCCAAGGTGCTAGACGCTCTATATCGATGAGGACGAAAGGCC * * * * *	651
Microbacterium	CCGACGGGGCTCACCGCCGGCGGACGGTCCACCACATCGCCTTCCGCGTGCCGGACCAA	687
Pseudomonaputida	GGCTCGTCAATCTACGGTGAAGGTACGATCCATCACGTCGCTTTCGCCCTGGATAACAT	696
Sphingobium	GGCACCTGGGCGCTTGCGCAAGGCCAAGTTCATCAG-CCGCGTTTGAAGTCGCCGACCTC	710
Pseudomoaerugi ITRC-5	GGCACCTGGGCGCTTGCGCAAGGCCAAGTTCATCAGCCCGCGTTTGAAGTCGCCGACCTC	711
Sphingobijaponi	GGCACCTGGGCGCTTGCGCAAGGCCAAGTTCATCAGCCCGCGTTTGAAGTCGCCGACCTC	711
Sphingomonpaucimobilis	GGCACCTGGGCGCTTGCGCAAGGCCAAGTTCATCAGCCCGCGTTTGAAGTCGCCGACCTC * * * * *	711
Microbacterium	GAGACGACAGCAGTGGCGCGACGAGCTCGT---CTCGCGCGACACAGGTGACGGAG	744
Pseudomonaputida	GAGCAGCAATGGCGTTGAAAGAGAAGTTGATGGCGATGGGGCATATCGATACCTCCGAA	756
Sphingobium	GACGTGCAGGCGCGCTCAAATTTGACGTGGAAGGCCTCGGCTACACCCGATTTCTCAGAT	770
Pseudomoaerugi ITRC-5	GACGTGCAGGCGCGCTCAAATTTGACGTGGAAGGCCTCGGCTACACCGATTTCTCAGAT	771
Sphingobijaponi	GACGTGCAGGCGCGCTCAAATTTGACGTGGAAGGCCTCGGCTACACCGATTTCTCAGAT	771
Sphingomonpaucimobilis	GACGTGCAGGCGCGCTCAAATTTGACGTGGAAGGCCTCGGCTACACCGATTTCTCAGAT ** * * *	771
Microbacterium	ATCCTCGACCGCCAGTACTTTCAGGACATCTACTTCCGCGAGCCCGCGCGCTGCTGTTT	804
Pseudomonaputida	TCAGTGCATCGGAATTACTTCCGCTCCATGTATTTCAAATGCGCGGCGGGGTGATGTTT	816
Sphingobium	CGCAAGCACCGCGGCTACTTCGAATCGATCTACGTTTCGTACGCGGGCGCGCTGTTGTTT	830
Pseudomoaerugi ITRC-5	CGCAAGCACCGCGGCTACTTCGAATCGATCTACGTTTCGTACGCGGGCGCGCTGTTGTTT	831
Sphingobijaponi	CGCAAGCACCGCGGCTACTTCGAATCGATCTACGTTTCGTACGCGGGCGCGCTGTTGTTT	831
Sphingomonpaucimobilis	CGCAAGCACCGCGGCTACTTCGAATCGATCTACGTTTCGTACGCGGGCGCGCTGTTGTTT * * * * *	831
Microbacterium	GAGATCGCCACCGACACCCCGGCTTCGACATCGACGAGCCGCTCCTCGAACTCGGCCG	864
Pseudomonaputida	GAGGCGGCTTACCACCGACATCGGCTTTGCCATCGACGAACCGCAAGACGAGCTTGGTTTC	876
Sphingobium	GAAGCCTCGGTACGC---TTGGTTTACCCATGACGAGAGCCCGGAGAGCTCGGCAGC	887
Pseudomoaerugi ITRC-5	GAAGCCTCGGTACGC---TTGGTTTACCCATGACGAGAGCCCGGAGAGCTCGGCAGC	888
Sphingobijaponi	GAAGCCTCGGTACGC---TTGGTTTACCCATGACGAGAGCCCGGAGAGCTCGGCAGC	888
Sphingomonpaucimobilis	GAAGCCTCGGTACGC---TTGGTTTACCCATGACGAGAGCCCGGAGAGCTCGGCAGC ** * * *	888
Microbacterium	GCCCTCAAGCTACCGCGGTGGCTCGAGCCCTCCCGCAGGCAATCGAGGCTGCCGTCGTG	924
Pseudomonaputida	GAGTTCAGCTTCCATCTGGCTCAGCGCGCAAGACGAGTTACTCGCC-----	927
Sphingobium	GAGGTCAAGGTTCGCGCGCAGCTCGAAGGTGTAA-----	921

Pseudomaerugi ITRC-5	GAGGTCAAGGTCGCGCCGCGAGCTCGAAGGTGTAAAGGACGAGCTCCTCCGG-----	939
Sphingobjaponi	GAGGTCAAGGTCGCGCCGCGAGCTCGAAGGTGTAAAGGACGAGCTCCTCCGG-----	939
Sphingomonpaucimobilis	GAGGTCAAGGTCGCGCCGCGAGCTCGAAGGTGTAAAGGACGAGCTCCTCCGG-----	939
	* * * * *	
Microbacterium	CCGGTGCAGCTTCCGGCTGAGAACAACCCGGGGGCGGCAGCATGA	969
Pseudomonaputida	CGGCTAGAG---CCGATTTCCTGTATAG-----	951
Sphingobium	-----	921
Pseudomaerugi ITRC-5	ACGATGAACGATCCGATCGTCATTTGA-----	966
Sphingobjaponi	ACGATGAACGATCCGATCGTCATTTGA-----	966
Sphingomonpaucimobilis	ACGATGAACGATCCGATCGTCATTTGA-----	96

Alineamiento genes *fur* (Control Positivo)

Pseudomaeruginosa	-----TTACTTTTCTTTC-----GTACGTAGAGCACCAGATTGTGATCGAC	42
Sphingompaucimobilis	ATGGCCCGCAAAATCGATCTCGAAGCGCTGTGCGCACAAAAGGGACTGCGCATCACCGAA	60
Sphingojaponicum	ATGAACCGCAAGATCGAGCTCGAAGCCCTTTGCCATGAAAAGGGCTGCGCATCACCGAA	60
	* * *	
Pseudomaeruginosa	CAGTTCGAAGCCGCGCTCGCGCACGATCTCCTTCTGCGGCTTCTCGATCTCGGCATCCAT	102
Sphingompaucimobilis	CAG---CGCCGCGTGTATCGCCCGCTCCTGTGCGAGGCGGAGGACCATCCGGACGTGGAA	117
Sphingojaponicum	CAG---CGCCGCGTGTATCGCCCGCTGCTGAGCGATTCCACCGATCACCCGGACGTGGAG	117
	*** ** *	
Pseudomaeruginosa	GAACTCGATCACT---TCGCCGGTATCGACGCAGACCATGTGGTGTGGTGGCCGCTGTC	159
Sphingompaucimobilis	AAGGTCTATGAGCGCGCTGCCAAGATCGATCCGGGCATCTCGATCGC---GACCGTCTAC	174
Sphingojaponicum	GAACTGCACAGGCGCTCCGCCGCCATCGATCCGGGCATTTGATCGC---CACCGTGTAC	174
	* * *	
Pseudomaeruginosa	GGCAAGCTCGAACCGGCATGGCCGCCATCGAAGTTGTGACGCACCACAGGCCGGCGGC	219
Sphingompaucimobilis	CGCACGGTCCGCCTATTCGAGGAAGCGGGCATCTCGACCCGCATGATTTGCGCGATGGG	234
Sphingojaponicum	CGCACCGTCCGCCTGTTTCGAGGAAGCGGGCATATTGACCGGCACGATTTGCGGGACGGC	234
	*** ** *	
Pseudomaeruginosa	CTCGAACTGGGTGACGACCCGATAGACGGTCGCCAGGCCACGTCTCGCCGCATCCAT	279
Sphingompaucimobilis	CGCGCACGCTACGAACCTCGCCCGAGGCGCATCACGACCATCTGATCG---ATGTCGAG	291
Sphingojaponicum	CGCGCCCGTTATGAGGCGGCGCCCGAATCCCATCACGACCATCTGATCG---ATGTCGAA	291
	* * *	
Pseudomaeruginosa	CAGCGCCTTGACACGCTCTCGGCGCTCATGTGGCGTTGCTCGGCGGAGTCGAGCATCTG	339
Sphingompaucimobilis	ACCGGCCGAGTGATCGAGTTCTGTCGAC-----CCCGAACTGGAACAGCTC	336
Sphingojaponicum	ACCGGCAATGTCATCGAATTCGTCGAT-----CCCGAACTGGAGCAGCTT	336
	** * *	
Pseudomaeruginosa	CAGGATCTTGACCCGCGGAGGGTCACCTTAAGGCCGGCTTTTCGAAGTTCTGCTATTTTC	399
Sphingompaucimobilis	CAAAAGGCGATCGC-CGAGAAGCTGGGATTCGCGCTGGTCGATCACCGCATGGAACCTCA	395
Sphingojaponicum	CAGAAGCAGATCGC-CGAAAAGCTCGGCTTCGCGCTGGTCGACCCGGATGGAATTGTA	395
	** *	
Pseudomaeruginosa	AACCAT-----	405
Sphingompaucimobilis	CGGCGTCAGCCTCGACCGCAAGGGGTGA	423
Sphingojaponicum	CGGCGTGGCGCTCGACCGCAAGAGCTGA	423
	* *	

9.7 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL AJUSTE DE FUNCIONES DEL TEST DOSIS-RESPUESTA PARA EL ESTUDIO DEL METABOLISMO DE COMPUESTOS GLUCÍDICOS

Nota: Las siguientes tablas contiene los parámetros de las respuestas metabólicas glucídicas estudiadas, calculados por Rstudio. Los ajustes significativos los tenemos a partir del p-value 0.1. El error estándar residual refleja la bondad del ajuste, siendo los residuals la diferencia entre los valores predichos por la función ajustada al modelo y los valores reales de los puntos obtenidos. El valor más cercano a 0, será el más fiable.

La tabla correspondiente a Bailín no muestra valores de fiabilidad estadísticos, porque el ajuste realizado no es fiable para casi ningún compuesto, al no haber dado respuesta metabólica.

INQUINOSA-1					
Parámetro	Estimación	Error Std.	t-value	p-value	
b:β-metil D Glucósido	-245.93	1.00E+01	-24.593	2.20E-16	***
b:D-Xilosa	-0.86701	2.86E-02	-30.3405	2.20E-16	***
b:L-Eritrol	-1.2801	5.71E-02	-22.4158	2.20E-16	***
b:D-Manitol	-0.70749	2.54E-02	-27.8505	2.20E-16	***
b:N-Acetil D-Glucosamina	-14.734	9.39E+00	-1.5688	0.117767	
b:Ácido D-Glucosamínico	-2.9403	9.82E-01	-2.9929	0.002996	**
b:Glucosa 1-P	-23.536	9.60E+00	-2.4515	0.014801	*
b:D-L-α Glicerol Fosfato	-41.989	9.99E+00	-4.2012	3.52E-05	***
b:D-Cellobiosa	-746.82	1.00E+01	-74.682	2.20E-16	***
d:β-metil D glucósido	38.837	4.28E+00	9.0666	2.20E-16	***
d:D-Xilosa	2349.3	1.00E+01	234.9335	2.20E-16	***
d:L-Eritrol	5778.9	1.00E+01	577.8859	2.20E-16	***
d:D-Manitol	865.28	1.00E+01	86.5492	2.20E-16	***
d:N-Acetil D-Glucosamina	41.184	4.28E+00	9.6143	2.20E-16	***
d:Ácido D-Glucosamínico	79.101	7.45E+00	10.618	2.20E-16	***
d:Glucosa 1-P	51.478	4.73E+00	10.875	2.20E-16	***
d:D-L-α Glicerol Fosfato	52.865	4.48E+00	11.7885	2.20E-16	***
d:D-Cellobiosa	39.894	4.28E+00	9.3135	2.20E-16	***
e:β-metil D glucósido	28.807	1.00E+01	2.8807	0.004257	**
e:D-Xilosa	14274	1.00E+01	1427.368	2.20E-16	***
e:L-Eritrol	10909	1.00E+01	1090.895	2.20E-16	***
e:D-Manitol	5377.6	1.00E+01	537.7588	2.20E-16	***
e:N-Acetil D-Glucosamina	26.807	4.30E+00	6.227	1.62E-09	***
e:Ácido D-Glucosamínico	86.293	8.19E+00	10.5347	2.20E-16	***
e:Glucosa 1-P	49.062	2.41E+00	20.3278	2.20E-16	***
e:D-L-α Glicerol Fosfato	40.076	2.44E+00	16.4255	2.20E-16	***
e:D-Cellobiosa	25.356	1.00E+01	2.5356	0.011738	*
Códigos significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Error estándar residual 24.50843 (297 degrees of freedom)					

BAILÍN-6				
Parámetro	Estimación	Error Std.	t-value	p-value
b:β-metil D Glucosido	-0.00132	NA	NA	NA
b:D-Xilosa	-0.00028	NA	NA	NA
b:L-Eritrol	-0.82968	NA	NA	NA
b:N-Acetil	-0.29847	NA	NA	NA
b:Ácido	-7.3217	NA	NA	NA
b:D-L-α	-15.336	NA	NA	NA
b:D-Cellobiosa	-0.19341	NA	NA	NA
d:β-metil	18.945	NA	NA	NA
d:D-Xilosa	39.197	NA	NA	NA
d:L-Eritrol	106.93	NA	NA	NA
d:N-Acetil	100.93	NA	NA	NA
d:Ácido	59.657	NA	NA	NA
d:D-L-α	38.196	NA	NA	NA
d:D-Cellobiosa	101.97	NA	NA	NA
e:β-metil	4.0056	NA	NA	NA
e:D-Xilosa	1523900	NA	NA	NA
e:L-Eritrol	601.11	NA	NA	NA
e:N-Acetil	1088.3	NA	NA	NA
e:Ácido	37.753	NA	NA	NA
e:D-L-α	36.198	NA	NA	NA
e:D-Cellobiosa	486.75	NA	NA	NA

SARDAS-1					
Parámetro	Estimación	Error Std.	t-value	p-value	
b:D-Xilosa	-4.8465	3.025	-1.6021	0.11032	
b:L-Eritrol	-3.5127	0.18742	-18.7425	2.20E-16	***
b:N-Acetil D-Glucosamina	-11.165	8.3509	-1.337	0.182367	
b:Ácido D-Glucosamínico	-1.271	0.49243	-2.5811	0.01039	*
b:D-L-αGlicerolFosfato	-1.5934	0.68865	-2.3138	0.021448	*
b:D-Cellobiosa	-0.58597	0.05468	-10.7164	2.20E-16	***
b:β-metil D Glucosido	12.428	10	1.2428	0.215039	
b:D-Manitol	-1.1606	0.21724	-5.3424	1.98E-07	***
d:D-Xilosa	57.979	7.2042	8.048	2.88E-14	***
d:L-Eritrol	2861.6	10	286.1597	2.20E-16	***
d:N-Acetil D-Glucosamina	18.827	5.4151	3.4768	0.000593	***
d:Ácido D-Glucosamínico	75.35	7.5927	9.924	2.20E-16	***
d:D-L-αGlicerolFosfato	69.765	7.6455	9.125	2.20E-16	***
d:D-Cellobiosa	390.29	9.9979	39.0366	2.20E-16	***
d:β-metil D glucósido	-0.00581	8.3602	-0.0007	0.999446	
d:D-Manitol	143.86	9.8518	14.6027	2.20E-16	***
e:D-Xilosa	94.284	8.2806	11.3861	2.20E-16	***
e:L-Eritrol	638.16	9.9953	63.8456	2.20E-16	***
e:N-Acetil D Glucosamina	64.387	8.7181	7.3854	1.99E-12	***
e:Ácido D-Glucosamínico	121.04	9.7371	12.4307	2.20E-16	***
e:D-L-α Glicerol Fosfato	48.461	8.3491	5.8043	1.85E-08	***
e:D-Cellobiosa	16333	10	1633.272	2.20E-16	***
e:β-metil D glucósido	0.26826	10	0.0268	0.978619	
e:D-Manitol	427.39	9.9929	42.769	2.20E-16	***
Error estándar residual : 26.25779 (264 grados de libertad)					