

Degradación de isómeros del hexaclorociclohexano (HCH) por *Anabaena* PCC7120

Jorge Guío Martínez

Trabajo Fin de Grado
2018



Universidad
Zaragoza



Departamento de
Bioquímica y Biología
Molecular y Celular
Universidad Zaragoza

Universidad de Zaragoza

Facultad de Ciencias



Degradación de isómeros del hexaclorociclohexano
(HCH) por *Anabaena* PCC7120

Degradation of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers
by *Anabaena* PCC7120

Proyecto Fin de Grado en Biotecnología dirigido por:

Emma Sevilla Miguel

María Luisa Peleato Sánchez

Jorge Guío Martínez

Año 2018



**Departamento de
Bioquímica y Biología
Molecular y Celular
Universidad Zaragoza**

Las profesoras Emma Sevilla Miguel y María Luisa Peleato Sánchez

CERTIFICAN

Que la memoria titulada “Degradación de isómeros del hexaclorociclohexano (HCH) por *Anabaena* PCC7120” presentada por Jorge Guío Martínez ha sido realizada bajo su dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología molecular.

A su juicio, reúne todos los requisitos para ser presentada por su autor para la defensa de su Trabajo Fin de Grado

Zaragoza a 25 de junio de 2018

Emma Sevilla Miguel

María Luisa Peleato Sánchez

“Sic parvis magna”

(La grandeza nace de pequeños comienzos)

Sir Francis Drake

Agradecimientos

Quiero dar las gracias a Dios, a mi familia y a mis amigas Raquel Alonso, Laura Cambroner, Blanca Dehesa, Alba García, Vicky Peña, Sara Sentre y Blanca Urmeneta, porque no me han dejado nunca y han estado siempre a mi lado. Asimismo quiero agradecer su apoyo y su ayuda a todos los miembros del grupo de Fisiología y Regulación Génica de Cianobacterias, en especial a Marisa y Emma, por permitirme realizar este trabajo bajo su dirección.

Por último me gustaría dar también las gracias a Antonio Guillén por la realización de las fotografías de microscopía y a los doctores Jesús Fernández del Laboratorio de Análisis de Bailin II (Huesca) y Enrique Navarro del Instituto Pirenaico de Ecología (CSIC) por las muestras proporcionadas, los análisis realizados y el asesoramiento y facilidades proporcionadas para la realización de este trabajo.

Índice

1. Resumen/Abstract	1
2. Introducción	2
2.1. Las cianobacterias.....	2
2.2. El lindano y otros isómeros del hexaclorociclohexano.....	2
2.3. Biodegradación del hexaclorociclohexano.....	3
2.4. <i>Anabaena</i> PCC 7120 y otras cianobacterias en biorremediación.....	4
3. Objetivos	5
4. Materiales y métodos	5
4.1. Organismos y condiciones de cultivo.....	5
4.1.1. Cepas bacterianas.....	5
4.1.2. Condiciones de cultivo.....	5
4.1.3. Estudio de la respuesta de <i>Anabaena</i> PCC7120 a isómeros del HCH.....	6
4.1.3.1. Soluciones de isómeros de HCH empleadas en el estudio.....	6
4.1.3.2. Cultivos en medio líquido para el estudio de la tolerancia a los isómeros.....	6
4.1.3.3. Cultivos en medio líquido para el estudio de la degradación de isómeros.....	6
4.1.3.4. Cultivos en medio líquido para el estudio de la expresión génica y respuestas fisiológicas en presencia de α -HCH.....	6
4.2. Aproximaciones bioquímicas y métodos analíticos.....	7
4.2.1. Extracción de proteínas totales solubles.....	7
4.2.2. Determinación de proteína total soluble.....	7
4.2.3. Determinación de clorofila <i>a</i>	7
4.2.4. Determinación de ficobiliproteínas.....	7
4.2.5. Determinación de carotenoides.....	8
4.2.6. Medidas con el electrodo de oxígeno de tipo Clark.....	8
4.3. Análisis de la presencia de los isómeros α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ -HCH en sobrenadantes de cultivos de <i>Anabaena</i> PCC7120.....	8
4.4. Aislamiento y análisis de RNA total de <i>Anabaena</i> PCC7120.....	9
4.4.1. Precauciones durante el trabajo con RNA.....	9
4.4.2. Toma de muestras para aislamiento de RNA de <i>Anabaena</i> PCC7120.....	9
4.4.3. Extracción del RNA.....	9
4.4.4. Tratamiento con DNasaI.....	10
4.4.5. Gel de agarosa para comprobar la integridad del RNA.....	10
4.4.6. Cuantificación del RNA.....	10

4.4.7. Comprobación de la pureza del RNA aislado.....	10
4.4.8. Retrotranscripción.....	11
4.4.9. Estudios de expresión génica mediante RT-PCR.....	11
4.5. Estudios <i>in silico</i> de la ruta de degradación de HCH en <i>Anabaena</i> PCC7120.....	11
5. Resultados y discusión	12
5.1. Estudio de la tolerancia de <i>Anabaena</i> PCC7120 a α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ -HCH.....	12
5.2. Estudio de respuestas fisiológicas de <i>Anabaena</i> PCC7120 en presencia de isómeros del HCH.....	13
5.2.1. Efectos fisiológicos de la presencia de los isómeros α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ -HCH.....	13
5.2.1.1. Efectos en los niveles de proteína total soluble.....	13
5.2.1.2. Efectos en los niveles de pigmentos fotosintéticos.....	14
5.2.1.2.1. Clorofila <i>a</i>	14
5.2.1.2.2. Ficobiliproteínas.....	14
5.2.1.2.3. Carotenoides.....	15
5.2.3. Efectos la presencia de α -HCH en la tasa de fotosíntesis y respiración.....	15
5.2.4. Cambios en la expresión de los genes <i>cat</i> y <i>prxA</i> en presencia de α -HCH.....	16
5.3. Evolución de la concentración de los isómeros α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ -HCH en presencia de <i>Anabaena</i> PCC7120.....	17
5.4. Análisis de la expresión de genes homólogos a los genes <i>linB</i> y <i>linE</i> en presencia de α -HCH.....	19
5.5. Identificación de genes potencialmente implicados en la degradación de isómeros del HCH en <i>Anabaena</i> PCC7120 mediante estudios bioinformáticos.....	20
5.6. Discusión global.....	22
6. Conclusiones	23
Bibliografía	24

Abreviaturas

- 1,2,4-TCB: 1,2,4-triclorobenceno
- 1,3,4,6-TCDN: 1,3,5,6-tetracloro-1,4-ciclohexadieno
- 2,3,5,6-TCDL: 2,3,5,6-tetraclorociclohexanodiol
- 2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- 2,5-DCHQ: 2,5-diclorohidroquinona
- 2,5-DDOL: 2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol
- 3,4,5,6-TCCH: 3,4,5,6-tetracloro-1-ciclohexeno
- BCA: Ácido bicinconínico
- CHQ: clorohidroquinona
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- dNTPs: deoxirribonucleótidos trifosfato
- DTT: 1,4-ditiotreitol
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- GABA: Ácido gamma-aminobutírico
- γ -HMSA: ácido γ -hidroximuconico semialdehido
- HCH: Hexaclorociclohexano
- MA: maleilacetoacetato
- NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido
- PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- RMSD: Desviación de la media cuadrática

1. Resumen/Abstract

1.1. Resumen

El hexaclorociclohexano (HCH) fue ampliamente utilizado como pesticida entre 1930 y 1990 e inicialmente se aplicó como una mezcla técnica que contenía α -HCH (60-70%), β -HCH (5-12%), γ -HCH (10-15%) y δ -HCH (6-10%). Se sintetizaba por fotocloración del benceno, proceso en el cual se formaban los isómeros anteriores, aunque posteriormente solamente el isómero γ -HCH o lindano se comercializó, por ser el más efectivo y relativamente más biodegradable. Dado que este isómero constituía solo un 10-15% del total de isómeros, el resto eran enterrados o acumulados en vertederos, lo que ha generado zonas altamente contaminadas en distintos puntos del planeta.

Aunque el HCH es persistente y recalcitrante se han aislado algunos microorganismos capaces de degradar uno o más isómeros del HCH. Uno de ellos es *Anabaena* PCC7120, una cianobacteria filamentosa capaz de degradar lindano (γ -HCH). En este trabajo se ha analizado su tolerancia y respuestas fisiológicas en presencia de los isómeros α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ -HCH. También se ha estudiado su capacidad degradativa, midiendo la desaparición de los distintos isómeros en cultivos de *Anabaena* PCC7120. Los resultados muestran que es un organismo adecuado para plantear biorremediación de los isómeros α -HCH y γ -HCH, que prácticamente desaparecen por completo. Sin embargo los isómeros β -HCH y δ -HCH no son eliminados en su totalidad y son peor tolerados en las concentraciones utilizadas, afectando notablemente al crecimiento y fisiología de las cianobacterias.

Finalmente se ha estudiado la expresión de genes potencialmente implicados en la degradación de HCH y se han realizado estudios *in silico* para encontrar otros genes involucrados, sugiriendo la existencia de una ruta alternativa a la de microorganismos heterótrofos como *S. paucimobilis*.

1.2. Abstract

Hexachlorocyclohexane (HCH) was widely used as a pesticide between 1930 and 1990 and it was firstly applied as a technical mixture which contained α -HCH (60-70%), β -HCH (5-12%), γ -HCH (10-15%) and δ -HCH (6-10%). It was synthesized by benzene photochloration, a process in which the aforementioned isomers were formed, although later only the γ -HCH isomer or lindane was commercialized, because it was a most effective and relatively more biodegradable isomer. As this isomer represented only a 10-15% of the whole of isomers, the rest of them were buried or collected in landfills, something which has created highly polluted areas in different places of the world.

Although HCH is durable and recalcitrant some microorganisms capable of degrading one or more HCH isomers have been isolated. One of them is *Anabaena* PCC7120, a filamentous cyanobacteria which is able of degrading lindane (γ -HCH). In this work its tolerance and physiological responses in the presence of α -HCH, β -HCH, γ -HCH and δ -HCH isomers has been analyzed. On the other hand its degradative capacity has also been studied by testing the disappearance of different isomers in *Anabaena* PCC7120 cultures. Results show that it is an appropriate organism to pose biorremediation of α -HCH and γ -HCH isomers, which almost totally disappear. Nevertheless, β -HCH and δ -HCH isomers are not totally eliminated and they are less tolerated in the concentrations used in this study, notably affecting cyanobacteria growth and physiology.

Finally the expression of genes potentially implicated in HCH degradation has been studied and different *in silico* studies have been carried out in order to find other genes involved in this process. These works suggest the existence of an alternative pathway different to that of heterotrophic microorganism such as *S. paucimobilis*.

2. Introducción

2.1. Las cianobacterias

Las cianobacterias son los procariotas fotosintéticos más diversos y versátiles. Se clasifican dentro de las Eubacterias, constituyendo uno de los subgrupos más grandes de Gram negativos. Aunque conocer su origen es complejo, se ha propuesto que las cianobacterias se originaron hace 3000-3500 millones de años, a finales de la era Arcaica y principios de la Proterozoica, desempeñando un papel fundamental en la transformación de la atmósfera reductora en una atmósfera oxidante (1). Esto se debe a que desarrollaron la fotosíntesis oxigénica, es decir, fueron capaces de utilizar el sustrato más abundante, el agua, como fuente de electrones, con la consiguiente liberación de oxígeno.

Además las cianobacterias son microorganismos muy ubicuos que pueden encontrarse en ambientes muy diversos, desde océanos o ríos hasta rocas o suelos, pasando por fuentes hidrotermales o el permafrost y pueden establecer asociaciones simbióticas con otros organismos, por ejemplo, el género *Nostoc* puede asociarse con plantas del género *Azolla* y llevar a cabo la fijación de nitrógeno (2). Desde el punto de vista tecnológico las cianobacterias son interesantes porque pueden utilizarse para la producción de metabolitos de interés, biocombustibles y fertilizantes (3). Su mayor ventaja es que al ser organismos fotosintéticos utilizan la luz como fuente de energía, lo que reduce el aporte de nutrientes y en el caso de los fijadores de nitrógeno la necesidad de aportar una fuente de este elemento.

Recientemente se ha propuesto el uso de cianobacterias para la biorremediación de contaminantes, pues han mostrado ser efectivas en la degradación de pesticidas y xenobióticos (4, 5). Principalmente se propone su uso para el tratamiento de efluentes industriales o en ambientes acuáticos, por ejemplo géneros como *Synechococcus* o *Aphanocapsa* han sido utilizados para la eliminación de crudos en aguas contaminadas (6).

2.2. El lindano y otros isómeros del hexaclorociclohexano

El hexaclorociclohexano (HCH) fue ampliamente utilizado en el periodo comprendido entre 1930 y 1990 como insecticida para el control de plagas en cultivos agrícolas o para evitar las enfermedades infecciosas transmitidas por vectores. No obstante actualmente está prohibido en muchos países por su toxicidad en humanos y su persistencia y acumulación en el medio ambiente, incluyendo aguas, suelos y aire, y en la cadena trófica (7).

Además de su persistencia el mayor problema del lindano lo constituye su fabricación. El HCH se obtiene mediante la fotocloración del benceno a través de una reacción en cadena en la que se produce la homólisis del Cl_2 por la radiación UV, lo que da lugar a radicales Cl^\cdot que se adicionan a la molécula de benceno. Este proceso permite obtener una mezcla de estereoisómeros conocida como HCH-técnico que contiene: 55% de α -HCH, 5-14% de β -HCH, 8-15% de γ -HCH, 2-16% de δ -HCH y cantidades minoritarias de los isómeros ϵ -HCH, η -HCH y θ -HCH, los cuales se diferencian en la estereoquímica de los átomos de cloro en el anillo de ciclohexano (que pueden ocupar una posición axial o ecuatorial) (8). Esta mezcla puede ser purificada para obtener el isómero γ -HCH o lindano, que es el isómero más biodegradable y con mejores propiedades como insecticida, originando hasta un 80% de material residual, el cual está constituido principalmente por los isómeros α -HCH y β -HCH mezclados con los disolventes utilizados en la purificación.

En los últimos años el HCH se ha convertido en un contaminante emergente de gran importancia, debido al vertido incontrolado de estos residuos originados en la producción industrial del lindano y al uso de este compuesto como pesticida en agricultura, destacando los focos de contaminación de Lucknow (India), Río de Janeiro (Brasil), Sabinánigo (España) y Pontevedra (España) (9). La contaminación por HCH supone un riesgo para la salud, pues además de encontrarse en grandes cantidades y liberarse de forma continua al medio ambiente los isómeros del HCH son escasamente biodegradables y se ha descrito que pueden ser tóxicos tanto en humanos como en otros vertebrados. Aunque los mecanismos de toxicidad no se conocen con precisión se ha propuesto que en humanos, al igual que en los insectos, los isómeros del HCH bloquean el receptor del ácido γ -aminobutírico (GABA) y producen estrés oxidativo generalizado (10).

El receptor GABA permite al sistema nervioso central volver a una situación de reposo tras haber estado sometido a un determinado estrés, pues da lugar a una hiperpolarización neuronal, y por tanto su bloqueo se asocia con los efectos tóxicos de la exposición al HCH. La intoxicación aguda se manifiesta con hiperexcitabilidad neuronal y convulsiones, que pueden conducir a la muerte en casos muy graves, y la intoxicación crónica se manifiesta con trastornos del sueño, estrés, mareos y vómitos frecuentes e hipersensibilización general (10). Además de estos efectos también se ha descrito toxicidad hepática, cáncer de hígado y trastornos en el sistema reproductor (11).

2.3. Biodegradación del hexaclorociclohexano

En el medio ambiente el HCH puede sufrir diferentes procesos físicos, químicos y biológicos que incluyen paso a la atmósfera por volatilización, descomposición por acción de la luz y transporte a aguas superficiales o del subsuelo (12). No obstante dado que se trata de un compuesto tóxico y bastante persistente un aspecto muy relevante a considerar es la capacidad de organismos biológicos como plantas o microorganismos de eliminarlo, es decir, la biorremediación.

Los primeros indicios de la degradación microbiana de isómeros del HCH datan de la década de 1960. En primer lugar se descubrió la degradación anaeróbica de los isómeros α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ -HCH en microorganismos anaerobios como *Clostridium butyricum* o *Citrobacter freundii*. Se observó que los isómeros γ -HCH y α -HCH se degradaban más rápidamente y que la degradación consistía básicamente en dicloroeliminaciones y dehidroclorinaciones sucesivas dando lugar a productos como 3,4,5,6-tetracloro-1-ciclohexeno (3,4,5,6-TCCH), clorobenceno y benceno (13).

Posteriormente se descubrió una ruta aerobia que ha sido caracterizada principalmente en miembros de la familia *Sphingomonadaceae*, la mayor parte aislados de zonas contaminadas por HCH. Se sabe que en esta ruta participan un conjunto de genes denominados genes *lin* y que, a diferencia de otros genes implicados en la degradación de contaminantes, no forman parte de un operón, sino que se encuentran dispersos por el genoma (14).

De todos los isómeros del HCH el que puede ser degradado con mayor facilidad es el γ -HCH. En *Sphingobium* su ruta de degradación comienza con dos dehidroclorinaciones catalizadas por la proteína LinA para dar lugar a 1,3,4,6-tetracloro-1,4-ciclohexadieno (1,3,4,6-TCDN), que es transformado en 2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol (2,5-DDOL) por la proteína LinB, que cataliza dos dechlorinaciones hidrolíticas sucesivas. A continuación se produce una reacción de dehidrogenación catalizada por la proteína LinC dando lugar a 2,5-diclorohidroquinona (2,5-DCHQ) y posteriormente una dechlorinación reductiva catalizada por la proteína LinD que da lugar a clorohidroquinona (CHQ). En este punto la ruta se bifurca, parte de la CHQ se transforma en ácido γ -hidroximuconico semialdehído (γ -HMSA) tras la actuación de las proteínas LinD y LinE y otra parte se transforma en un cloruro de acilo por acción de la proteína LinE. Ambos compuestos se

piensa que de forma espontánea dan lugar a maleilacetoacetato (MA) el cual puede transformarse en β -ceto adipato por acción de la proteína LinF, que tras la actuación de LinGH y LinJ da lugar a succinil-CoA y acetyl-CoA los cuales son metabolizados por el ciclo de Krebs (sección 8.1 de material suplementario) (13). En *Sphingomonas* se ha descrito que los genes *linE* y *linD* son inducibles por intermediarios de la ruta gracias a la acción de LinR, que es un activador transcripcional, mientras que el resto de genes son constitutivos (14).

El isómero α -HCH puede ser degradado hasta 1,2,4-triclorobenceno (1,2,4-TCB) por reacciones de dechlorinación pero a diferencia del γ -HCH no puede ser mineralizado por completo hasta CO₂ y H₂O (13). El β -HCH es el isómero más recalcitrante, pues tiene todos los sustituyentes en posición ecuatorial, lo que impide las reacciones de dehidroclorinación y solo permite su degradación hasta 2,3,5,6-tetraclorociclohexanodiol (2,3,5,6-TCDL) y el δ -HCH puede ser o bien degradado parcialmente por la ruta del γ -HCH o bien degradado de forma similar al β -HCH pero resulta tóxico para los microorganismos porque su degradación genera metabolitos tóxicos (13, 15). No obstante estos no son los únicos organismos capaces de biodegradar lindano, pues otros microorganismos como las cianobacterias también pueden llevar a cabo este proceso.

2.4. *Anabaena* PCC 7120 y otras cianobacterias en biorremediación

Las cianobacterias se han postulado como agentes muy adecuados para la biorremediación pues presentan numerosas ventajas: (a) son microorganismos autótrofos capaces de usar el CO₂ como fuente de carbono y en ocasiones fijar el N₂ atmosférico, lo que disminuye los costes de mantenimiento (b) las cianobacterias filamentosas pueden formar heterocistos, que son células completamente aisladas del oxígeno en las que podría tener lugar la degradación de compuestos por procesos anaeróbicos, (c) pueden crecer en ambientes acuáticos y (d) tras la degradación de los contaminantes pueden ser utilizadas como biomasa para la producción de biocombustibles (16).

Como se ha comentado previamente, las cianobacterias han mostrado ser muy efectivas como acumuladores o degradadores de contaminantes ambientales (4,5). Además pueden ser usadas para el tratamiento de aguas residuales, convirtiendo los nutrientes que podrían dar lugar a problemas de eutrofización en biomasa, y pueden ser modificadas genéticamente para incrementar su capacidad de degradación o degradar otros compuestos. Despierta gran interés el estudio de su capacidad para degradar pesticidas organoclorados como el lindano en ambientes acuáticos, pues estos compuestos son tóxicos y persistentes y pueden contaminar ríos, mares, océanos o aguas subterráneas por lavado y lixiviación de la lluvia (17).

Anabaena PCC7120 es una cianobacteria filamentosas fijadora de nitrógeno en heterocistos que es considerada una cianobacteria modelo y que junto con *Nostoc ellipsosporum* ha sido descrita como capaz de degradar lindano (γ -HCH) (18). Estudios realizados con ambos microorganismos mostraron que la disminución del contenido de isómeros en el sobrenadante no se debía únicamente a la captación de este compuesto por las células sino que el pesticida era metabolizado, dando lugar a intermediarios como 1,2,4-triclorobenceno que posteriormente también se metabolizaban, y que la degradación se producía de forma mucho más lenta en ausencia de nitrato, que es esencial para la dechlorinación del compuesto. En cianobacterias la degradación de lindano requiere la presencia de un operón *nir* funcional, pues se piensa que la dechlorinación puede ser llevada a cabo por un complejo de reducción nitrato-nitrito de la membrana o que el transporte del lindano puede depender de proteínas implicadas en el transporte y reducción del nitrato (19). Además, otras cianobacterias, como *Anabaena* PCC7119 (20) o *Microcystis aeruginosa* PCC7806 (21) también muestran alta tolerancia al lindano y capacidad de degradación.

3. Objetivos

El lindano es un contaminante muy ubicuo y hay descritos algunos microorganismos capaces de degradarlo. El mayor reto lo constituyen los otros isómeros producidos en la fabricación del pesticida pero apenas hay trabajos encaminados a estudiar su degradación. Por ello el propósito de este trabajo es estudiar la respuesta de la cianobacteria *Anabaena* PCC7120 a la presencia de isómeros del HCH y analizar la degradación de los mismos con la intención de determinar si es un organismo apropiado para su biodegradación. Así, se establecen los siguientes objetivos:

- Estudiar la tolerancia y respuesta fisiológicas de *Anabaena* PCC7120 en presencia de diferentes concentraciones de cuatro isómeros del hexaclorociclohexano: α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ -HCH.
- Estudiar la degradación de los isómeros α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ -HCH por *Anabaena* PCC7120
- Analizar la expresión de genes potencialmente implicados en la biodegradación del HCH en *Anabaena* PCC7120 en presencia de α -HCH.
- Identificar potenciales genes implicados en la degradación de isómeros del HCH en *Anabaena* PCC7120 mediante estudios bioinformáticos

4. Materiales y métodos

4.1 Organismos y condiciones de cultivo

4.1.1. Cepas bacterianas

La cepa bacteriana empleada para la realización de estos estudios fue *Anabaena* PCC7120 (*Nostoc* PCC7120) procedente de la Colección de Cultivos de Cianobacterias del Instituto Pasteur (22).

4.1.2. Condiciones de cultivo

En los estudios de tolerancia las cianobacterias se cultivaron en medio BG11 estéril, cuya composición es 1.35 g/L de NaNO₃, 0.738 g/L de NaHCO₃, 0.04 g/L de K₂HPO₄ · 3 H₂O, 0.036 g/L de CaCl₂ · 2 H₂O, 0.075 g/L de MgSO₄ · 7 H₂O y 0.02 g/L de Na₂CO₃ suplementado con 1 mL de solución de micronutrientes de composición 6 g/L de citrato férrico amónico, 6 g/L de ácido cítrico, 1 g/L de EDTA, 2.86 g/L de H₃BO₃, 1.81 g/L de MnCl₂ · 4 H₂O, 0.22 g/L de ZnSO₄ · 7 H₂O, 0.39 g/L de Na₂MoO₄ · 2 H₂O, 0.079 g/L de CuSO₄ · 5 H₂O y 0.0494 g/L de CoCl₂ por cada litro de solución basal (23). Puesto que se había descrito que el amonio inhibía la degradación del γ -HCH en *Anabaena* PCC7120, en particular la de clorinación (19) los ensayos posteriores se realizaron en medio BG11 modificado, con la misma composición que el anterior pero en el que el citrato férrico amónico se sustituyó por 8.34g/L de FeSO₄ · 7 H₂O. En ambos casos los medios de cultivo se prepararon con agua destilada sin ajustar pH, se esterilizaron en autoclave y se conservaron a 4 °C en oscuridad.

Todos los estudios se realizaron en cultivos en medio líquido empleando erlenmeyers de 250 mL y se mantuvieron con una intensidad de luz constante de 30 $\mu\text{mol fotones s}^{-1} \text{m}^{-2}$ y una temperatura de 27 °C en un incubador orbital Innova 43[®] a 100 rpm. Los cultivos de partida se crecieron en medio líquido, en un frasco Roux burbujeadado con aire estéril (filtrado con un filtro de 0,22 μm) para una adecuada agitación y aireación. Se mantuvieron a una temperatura de 25-30 °C, con luz lateral de 30 $\mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

4.1.3. Estudio de la respuesta de *Anabaena* PCC7120 a isómeros del HCH

4.1.3.1. Soluciones de isómeros de HCH empleadas en el estudio

La concentración deseada de cada isómero de HCH en los cultivos en medio líquido de *Anabaena* PCC7120 se obtuvo añadiendo 10 μL de una solución ‘stock’ 10^4 veces más concentrada del isómero correspondiente en DMSO a 100 mL de cultivo. Los isómeros β -HCH, γ -HCH y δ -HCH fueron suministrados por la casa comercial Sigma-Aldrich y aunque se indicaba que su pureza era superior al 98% los estudios realizados mostraron que el valor real era considerablemente más bajo, mientras que el isómero α -HCH procedía del laboratorio de seguimiento y control del vertedero de Bailín del Gobierno de Aragón en Sabiñánigo y tenía una pureza del 84.60%.

4.1.3.2. Cultivos en medio líquido para el estudio de la tolerancia a los isómeros

Para llevar a cabo los estudios de tolerancia a los isómeros α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ -HCH se prepararon diez erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de cultivo de *Anabaena* PCC7120 en medio BG11 a una densidad óptica a 750 nm comprendida entre 0.25 y 0.3. Dos cultivos se dejaron como control y al resto se les añadieron cada uno de los isómeros del estudio a las concentraciones de saturación en medio acuoso (2 mg/L de α -HCH, 5 mg/L de β -HCH, 7 mg/L de γ -HCH y 5 mg/L de δ -HCH), con dos réplicas biológicas de cada condición.

En un segundo experimento se llevaron a cabo diez cultivos en erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de cultivo de *Anabaena* PCC7120 en medio BG11 a una densidad óptica a 750 nm comprendida entre 0.25 y 0.3. Las cianobacterias se cultivaron en presencia de las siguientes concentraciones de isómeros: 1 mg/L de β -HCH, 2 mg/L de β -HCH, 1 mg/L de δ -HCH y 2 mg/L de δ -HCH, respectivamente y por duplicado, dejando dos cultivos como control para tener dos réplicas biológicas de cada condición.

4.1.3.3. Cultivos en medio líquido para el estudio de la degradación de isómeros

Para estudiar la degradación de isómeros del HCH se prepararon diez erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de cultivo de *Anabaena* PCC7120 en medio BG11 modificado a una densidad óptica a 750 nm de 0.6. Dos de ellos se dejaron como control y los ocho restantes se cultivaron en presencia de 2 mg/L de α -HCH, 8 mg/L de β -HCH, 7 mg/L de γ -HCH, y 2 mg/L de δ -HCH, teniendo dos réplicas biológicas para cada isómero. Además se prepararon ocho erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de medio BG11 modificado a los que se añadieron las concentraciones anteriores de cada uno de los isómeros, teniendo dos réplicas de cada isómero, y se mantuvieron en las mismas condiciones que los cultivos anteriores, sirviendo así como controles de la evaporación y la degradación fotoquímica de los isómeros del HCH. En este ensayo todos los erlenmeyers se cubrieron con parafilm para minimizar la evaporación de isómeros del HCH.

4.1.3.4. Cultivos en medio líquido para el estudio de la expresión génica y respuestas fisiológicas en presencia de α -HCH

Para estudiar como la presencia de α -HCH afectaba a la expresión génica y a la fisiología de las cianobacterias se prepararon seis erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de cultivo de *Anabaena* PCC7120 en medio BG11 modificado a una densidad óptica a 750 nm de 0.4. Tres de ellos se dejaron como control y los tres restantes se cultivaron en presencia de 2 mg/L de α -HCH, teniendo así tres réplicas biológicas de cada condición

4.2. Aproximaciones bioquímicas y métodos analíticos

En este trabajo se emplearon las siguientes aproximaciones bioquímicas y métodos analíticos. Para analizar si los cambios en los parámetros eran o no significativos se llevó a cabo un análisis estadístico tipo t-test utilizando el software GraphPad Prism 6.

4.2.1. Extracción de proteínas totales solubles

Para obtener los extractos de proteínas totales solubles de cultivos de *Anabaena* PCC7120 se centrifugaron 50 mL del cultivo en un tubo Falcon a 4000 rpm (3082 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Allegra X 30R, se descartó el sobrenadante y el volumen restante se pasó a un tubo Eppendorf. Estos tubos se centrifugaron a 4000 rpm (1087 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R, se descartó el sobrenadante, resuspendiendo el precipitado en 1 mL de Tris 50 mM pH 8 y se añadió 10 µL de inhibidor de proteasas PMSF para obtener una concentración final de 1 mM.

Las células se rompieron por sonicación con 5 ciclos de 45 s a amplitud del 80% y ciclo 0.5 y 30 s de reposo en un sonicador UP 200S Dr. Hielscher®, con las muestras en un baño de hielo para evitar el calentamiento de la muestra. Por último la suspensión de células rotas se centrifugó a 12000 rpm (16260 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R y se utilizaron 450 µL de sobrenadante para obtener el extracto de proteínas totales solubles.

4.2.2. Determinación de proteína total soluble

La concentración de proteína total soluble en los extractos proteicos se determinó mediante el método del BCA, siguiendo el protocolo de la casa comercial ThermoFisher. El método se basa en la reducción en medio alcalino del Cu^{2+} a Cu^+ por el enlace peptídico, de modo que los iones Cu^+ se unen al BCA cambiando su estructura electrónica y absorbiendo a 562nm. Así, puesto que la absorbancia es proporcional a la concentración de proteínas, se puede determinar el contenido de proteína total soluble midiendo la absorbancia a 562 nm, empleando una recta de calibrado.

4.2.3. Determinación de clorofila *a*

El contenido de clorofila *a* de cada cultivo se determinó utilizando el procedimiento espectrofotométrico descrito por Marker en 1972 (24). Se tomó 1 mL de cultivo y se centrifugó a 12000 rpm (16620 x g) durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 1 mL de metanol y tras un minuto de agitación en vortex la suspensión se centrifugó a 12.000 rpm (16620 x g) durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R. La concentración de clorofila *a* en el sobrenadante se determinó midiendo la absorbancia a 665 nm en un espectrofotómetro SPECORD® PLUS utilizando como referencia metanol y teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción molar de la clorofila *a* es de $\epsilon = 74.46 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Todo el procedimiento se realizó en oscuridad, pues la clorofila *a* se degrada en presencia de luz.

4.2.4. Determinación de ficobiliproteínas

La concentración de ficobiliproteínas se calculó mediante el método descrito por Bryant et al. en 1976 (25), para lo cual se midió la absorbancia a 620 nm de los extractos de proteínas totales solubles en un espectrofotómetro SPECORD® PLUS, utilizando como referencia una solución de Tris 50 mM pH 8. El coeficiente de extinción molar de las ficobiliproteínas es de $\epsilon = 7.41 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.2.5. Determinación de carotenoides

La concentración de carotenoides se determinó mediante el método descrito por Davies y Taylor en 1976 (26). Se centrifugaron 5 mL del cultivo en un tubo Falcon a 4000 rpm (3082 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Allegra X 30R, se descartaron 4 mL de sobrenadante y el pellet se resuspendió en el volumen restante, que se pasó a un tubo eppendorf. Los tubos eppendorf se centrifugaron a 4000 rpm (1087 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R y se descartó el sobrenadante.

El precipitado se resuspendió en 1 mL de agua destilada y se rompieron las células por sonicación con 5 ciclos de 45 s a amplitud del 80% y ciclo 0.5 y 30 s de reposo en un sonicador UP 200S Dr. Hielscher®, con las muestras en un baño de hielo para evitar el calentamiento de la muestra. Finalmente la suspensión de células rotas se pasó a un tubo Falcon, se añadieron 4 mL de acetona y se centrifugaron a 3600 rpm (2500 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Allegra X 30R.

Para obtener la concentración de carotenoides se midió la absorbancia del sobrenadante a 480 nm, 465 nm y 663 nm en un espectrofotómetro SPECORD® PLUS, utilizando como referencia una solución de acetona, y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Abs carotenoides} = \text{Abs}_{480 \text{ nm}} + 0.144 \cdot \text{Abs}_{662 \text{ nm}} - 0.638 \cdot \text{Abs}_{465 \text{ nm}}$$

$$\text{Concentracion carotenoides (mg/mL)} = \frac{\text{Abs carotenoides}}{\epsilon \cdot l} \quad \text{donde } \epsilon = 250 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{cm}^{-1}$$

4.2.6. Medidas con el electrodo de oxígeno de tipo Clark

Se midió la producción y desaparición de oxígeno a lo largo del tiempo con un electrodo tipo Clark para determinar la tasa fotosintética y respiratoria de las cianobacterias tras 48 horas de exposición a 2 mg/L de α -HCH. Las mediciones se realizaron con el dispositivo Oxytherm (Hansatech) y los datos se procesaron con el software O₂View proporcionado por el fabricante. El protocolo para calibrar el dispositivo se recoge en la sección 8.2 de Material Suplementario.

Una vez calibrado el dispositivo se introdujo en la cámara de reacción 1mL de cultivo para medir la tasa fotosintética y respiratoria de los cultivos de cianobacterias. Para la tasa de respiración se midió la variación de concentración de oxígeno a 25 °C, en oscuridad y con un 65% de agitación y para la tasa de fotosíntesis se emplearon las mismas condiciones pero en lugar de en oscuridad se realizó la medición con intensidades luminosas de 40, 100 y 400 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \mu\text{g clorofila } a^{-1}$.

4.3. Análisis de la presencia de los isómeros α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ -HCH en sobrenadantes de cultivos de *Anabaena* PCC7120

Se tomaron 10 ml de sobrenadante de los cultivos indicados en el apartado 4.1.3.3. y se almacenaron herméticamente, en oscuridad y a -20 °C hasta que fueron analizados.

El análisis se llevó a cabo en los laboratorios de Análisis de HCH en las instalaciones de la nueva celda de seguridad de Bailín II (Sabiñánigo, Huesca). Los isómeros del HCH en matriz acuosa fueron extraídos empleando una extracción líquido-líquido y la cuantificación de la cantidad remanente de cada isómero se llevó a cabo utilizando cromatografía de gases con detector de masas (Agilent Serie 7890A). La identificación de isómeros se llevó a cabo empleando patrones individuales comerciales y todos los compuestos se cuantificaron sobre rectas de calibrado realizadas con los patrones estándar.

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

4.4.1. Precauciones durante el trabajo con RNA

Durante el trabajo con RNA es fundamental tener en cuenta la presencia de ribonucleasas (RNAsas), que son enzimas muy estables, activas y ubicuas, lo que implica tomar una serie de precauciones para evitar la degradación del RNA. Todas las etapas se llevaron a cabo empleando agua comercial libre de RNAsas, el material y buffers empleados se autoclavaron antes de su uso, se utilizaron puntas con filtro y la campana extractora, los guantes y todo el material utilizado se lavaron con NaOH 0.4 M.

4.4.2. Toma de muestras para aislamiento de RNA de *Anabaena* PCC7120

Para el aislamiento de RNA se tomaron muestras de los cultivos de *Anabaena* PCC7120 lo más rápidamente posible para que no cambiara la población de RNAs. Se centrifugaron 25 mL de cultivo a 4500 rpm (3900 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Allegra X 30R. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en el volumen restante, que se pasó a un eppendorf de seguridad de 2mL libre de RNAsas. A continuación estos tubos se centrifugaron a 12000 rpm (16260 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R, se eliminó el sobrenadante en su totalidad y se añadieron 600 µL de tampón Tris HCl 50 mM EDTA 100 mM a pH 8 y 130 µL de cloroformo, invirtiendo los tubos 4 veces y dejándolos reposar 3 min en baño de hielo. Finalmente los tubos se centrifugaron a 12000 rpm (16260 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R obteniendo tres fases: una superior acuosa, una intermedia formada por las células y una orgánica inferior que contiene el cloroformo. Primero se descartó la fase acuosa superior y después se atravesó la fase intermedia con la pipeta para eliminar la fase orgánica inferior, congelando las muestras en N₂ líquido y conservándolas a -80 °C hasta su posterior uso.

4.4.3. Extracción del RNA

Para extraer el RNA las muestras anteriores se descongelaron y se añadieron 300 µL de buffer de resuspensión (sacarosa 0.3 M, acetato de sodio 10 mM pH 4.5), 100 µL de disolución EDTA disódico 250 mM pH 8, 400 µL de buffer de lisis (2% de SDS, 10 mM de acetato de sodio pH 4.5) y 1 mL de fenol ácido a 65 °C. Los tubos se agitaron durante 30 s en vortex y se incubaron durante 2.5 min a 65 °C, repitiendo tres veces estas dos últimas operaciones.

Posteriormente se centrifugaron los tubos a 12000 rpm (16260 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R y se transfirió la fase acuosa superior a otro eppendorf, añadiendo 1 mL de trizol. Los tubos se agitaron durante 30 s en vortex, se dejaron reposar 5 min a temperatura ambiente y se añadieron 200 µL de cloroformo a cada tubo. A continuación se agitó en vortex durante 30 s, dejando reposar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm (16260 x g), a 4 °C durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R, transfiriendo 750 µL de la fase acuosa a otro eppendorf. Tras añadir un volumen de cloroformo, se agitó en vortex durante 30 s y se centrifugaron los tubos 5 min a 12000 rpm (16260 x g) en una centrífuga Eppendorf 5427R, transfiriendo la fase acuosa a otro eppendorf, repitiendo dos veces esta última serie de etapas. Por último se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto preenfriado, se agitó en vortex durante 30 s y se guardaron las muestras a -80 °C hasta su posterior uso.

Puesto que las muestras anteriores contienen DNA genómico además de RNA se realizó un tratamiento con DNasaI. Las muestras se descongelaron y se centrifugaron a 12000 rpm (16260 x g) y 4 °C durante 30 min en una centrífuga Eppendorf 5427R, se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µL de etanol al 70%, preenfriado a -20 °C. A continuación se centrifugaron las muestras a 12000 rpm (16260 x g) y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Eppendorf 5427R. Se descartó el sobrenadante y se dejaron secar los tubos a temperatura ambiente durante 1 h para evaporar el etanol. Por último el pellet se resuspendió en 90 µL de agua libre de RNasas.

4.4.4. Tratamiento con DNasaI

Se añadieron 10 µL de buffer DNasa y 2 µL de DNasaI libre de RNasas a los 90 µL de solución de RNA. El volumen resultante se pasó a tubos de PCR, que se incubaron en un termociclador durante 70 min a 37 °C y después a 65 °C durante 10 min para inactivar la enzima. El RNA extraído se conservó a -80 °C hasta su uso.

4.4.5. Gel de agarosa para comprobar la integridad del RNA

Se tomaron 2 µL de los RNAs extraídos, se mezclaron con un volumen igual de tampón de carga (Tris 50 mM pH 8, 30% (v/v) de glicerol y 0.25% (w/v) de azul de bromofenol), se cargaron en un gel de agarosa al 1% en tampón TBE (Tris 90 mM pH 8, 90 mM ácido bórico y 2 mM de EDTA) con 0,1% de bromuro de etidio y se sometieron a electroforesis para comprobar su integridad. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V durante 30 min utilizando una fuente BioRad PowerPac300. Los resultados se visualizaron con un equipo GelDoc200 (BioRad) y el programa MultiAnalist 1.1 (BioRad Laboratories, 1997).

4.4.6. Cuantificación del RNA

La concentración y pureza de los RNAs aislados se determinaron mediante espectrofotometría, empleando un espectrofotómetro SPECORD® PLUS. Se utilizaron cubetas de cuarzo, que se lavaron con NaOH 0.4M y se aclararon con agua libre de RNasas, y se realizó una línea base (250nm – 600nm) con agua libre de RNasas. A continuación se añadieron 390 µL de agua libre de RNasas a la cubeta de cuarzo y 10 µL del RNA correspondiente y se mezclaron invirtiendo las cubetas 4 veces. Se registraron los valores de absorbancia a 260 y 280 nm.

La absorbancia a 260 nm corresponde al máximo de absorción de los ácidos nucleicos mientras la absorbancia a 280 nm corresponde al máximo de absorción de los aminoácidos aromáticos y por tanto permite calcular la pureza de la muestra en cuanto a la presencia de proteínas. Si el ratio Abs_{260nm}/Abs_{280nm} está comprendido entre 1.8 y 2.0 la muestra presenta una alta pureza en RNA. La concentración de cada una de las muestras de RNA se calculó teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260 nm para el ssRNA corresponde a 40 µg/ml.

4.4.7. Comprobación de la pureza del RNA aislado

Aunque las muestras habían sido tratadas con DNasas, era posible que el RNA obtenido aún contuviera trazas de DNA, por lo que antes de la retrotranscripción se decidió determinar la presencia de DNA en las muestras de RNA mediante PCR a tiempo real (RT-PCR).

Se estimó que la concentración media de RNA era de 200 ng/µL, de modo que se tomaron 2.5 µL de RNA y se mezclaron con 500µL de agua libre de RNasas para tener una concentración final de 1 ng/µL y así determinar si a esa concentración de muestra, que será similar a la de la retrotranscripción, hay restos de DNA no procedentes de la retrotranscripción que pudieran interferir en la medición de la expresión de los genes.

Se preparó la mezcla de reacción del gen de referencia *rnpB*, un gen constitutivo que permite detectar la presencia de DNA, para lo cual se utilizaron 12.5 µL/pocillo de SyBr[®] Green Dye, 0.2 µL/pocillo de primer directo de *rnpB*, 0.2 µL/pocillo de primer reverso de *rnpB* y 7.1 µL/pocillo de agua libre de RNAsas. Se añadieron 20 µL de la mezcla de reacción y 10 µL de la dilución correspondiente en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se llevó a cabo la amplificación del DNA mediante en un equipo ViiA TM 7 Real Time PCR System (Applied Biosystem).

4.4.8. Retrotranscripción

Se llevó a cabo una retrotranscripción del RNA aislado para obtener cDNA (ssDNA) complementario al RNA, empleando ‘SuperScript Reverse Transcriptase[®]’ de GibcoBRL. Se añadieron en un tubo de PCR 2 µg de RNA, 1µL de solución de ‘random primers’ (300ng/µL), 2µL de tampón de hibridación (Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM y KCl 150 mM) y se completó el volumen hasta 20 µL con agua libre de RNAsas. Las muestras se desnaturalizaron durante 10 min a 85 °C, se hibridaron los ‘random primers’ durante 60 min a 50 °C y a continuación se añadieron a cada tubo 2 µL de mezcla de dNTPs 10 mM, 4 µL de DTT 0.1 M, 8 µL de tampón de retrotranscripción 5x, 5 µL de agua libre de RNAsas y 1 µL de SuperScript Retrotranscriptasa 200 U. La mezcla se incubó durante 60 min a 47 °C para que se produjera la extensión de los cebadores y durante 15 min a 75 °C para detener la reacción, conservando las muestras a 4 °C.

4.4.9. Estudios de expresión génica mediante RT-PCR

Para analizar los cambios en la expresión génica se utilizó la RT-PCR, en la que se cuantificaron los transcritos de interés retrotranscritos a cDNA y se normalizaron respecto al gen constitutivo *rnpB*. Para llevar a cabo la RT-PCR se preparó una mezcla de reacción para cada gen de estudio compuesto de 12.5 µL/pocillo de SyBr Green, 7.1 µL/pocillo de agua libre de RNAsas, 0.2 µL/pocillo de primer reverso 25 mM y 0.2 µL/pocillo de primer directo 25 mM y se añadieron en cada pocillo 20µL de mezcla de reacción y 10µL del cDNA de interés diluido 50 veces en agua libre de RNAsas, pues las rectas patrón realizadas previamente para los genes de interés mostraron que esta dilución era apropiada para estudiar cambios en la expresión de estos genes. El programa mediante el cual se llevó a cabo la RT-PCR, los oligonucleótidos utilizados y el tratamiento matemático de los datos se refleja en las secciones 8.3 y 8.4 de Material Suplementario

4.5. Estudios *in silico* de la ruta de degradación de HCH en *Anabaena* PCC7120

Con el objetivo de encontrar genes implicados en la degradación de isómeros del HCH en *Anabaena* PCC7120 se utilizó la base de datos ‘Cyanobase’ (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase>) para buscar potenciales genes *lin* en otras cianobacterias y el servidor ‘BlastP’ (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para buscar genes homólogos en *Anabaena* PCC7120. Las secuencias de las proteínas codificadas por los genes de interés se obtuvieron de la base de datos ‘Cyanobase’ en el caso de cianobacterias y de ‘UniProt’ (<http://www.uniprot.org/>) en el caso de *S. paucimobilis*. Los alineamientos múltiples de secuencias fueron realizados con ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) y para la obtención de árboles filogenéticos los alineamientos se compactaron mediante GBlocks (http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html). Se construyó un árbol filogenético empleando PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) y se visualizó mediante TreeDyn (<http://www.treedyn.org/>). Por último se llevaron a cabo modelados de estructuras tridimensionales mediante el servidor SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org/>) y acoplamiento proteína ligando mediante el servidor Swiss-Dock (<http://www.swissdock.ch/>), que se visualizaron empleando el software Pymol (PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0).

5. Resultados y discusión

5.1. Estudio de la tolerancia de *Anabaena* PCC7120 a α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ -HCH

Para determinar cómo los diferentes isómeros del HCH afectaban al crecimiento de *Anabaena* PCC7120 se estudió la variación de densidad óptica a 750 nm de los cultivos control y de las cianobacterias cultivadas con α -HCH (2 mg/L), β -HCH (5 mg/L), γ -HCH (7 mg/L) y δ -HCH (5 mg/L) a tiempo 0, 1, 2, 4, 7, 9, 11 y 14 días. En los cultivos en presencia de los isómeros β -HCH y δ -HCH, dado que se produjo la muerte de las bacterias, solo se realizaron mediciones hasta el día 11. Puesto que se pretendía determinar la concentración más alta de cada isómero que permite el crecimiento de *Anabaena* PCC7120, para así poder realizar estudios de biodegradación y de cambios en expresión la génica, las concentraciones empleadas corresponden al límite de solubilidad de cada isómero en agua (12). Estudios previos demostraron que el DMSO utilizado para disolver inicialmente los isómeros de HCH no afectaba al crecimiento de *Anabaena* PCC7120 (18, 27).

La Figura 1.A muestra que, para las concentraciones empleadas, el α -HCH y el γ -HCH apenas afectaron al crecimiento de *Anabaena* PCC7120 pues la evolución de la densidad óptica de estos cultivos fue muy próxima a la del control sin tratar. Se observó que en presencia de ambos isómeros el crecimiento se ralentizaba ligeramente a partir del día 4, pero que las concentraciones empleadas para ambos isómeros permitían el crecimiento de las cianobacterias, mostrando ser apropiadas para estudios posteriores. Como se refleja en la Tabla 1.A, el tiempo de duplicación de los cultivos se incrementó ligeramente en presencia del isómero γ -HCH pero no del α -HCH, lo que sugiere que el isómero α -HCH es mejor tolerado.

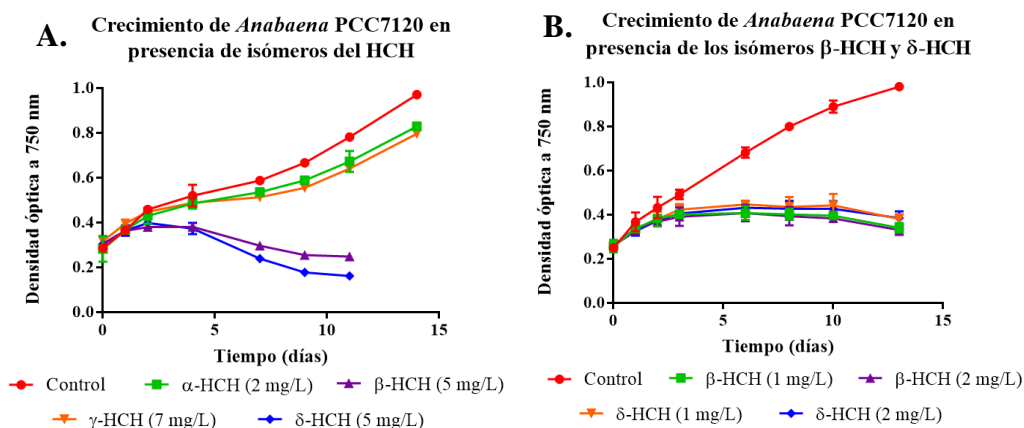


Figura 1. Curva de crecimiento de *Anabaena* PCC7120 en presencia de concentraciones de saturación en medio acuoso de los isómeros α -HCH (2 mg/L), β -HCH (5 mg/L), γ -HCH (7 mg/L) y δ -HCH (5 mg/L) (A) y en presencia de distintas concentraciones de los isómeros β -HCH y δ -HCH (B). **Nota.** Se representa la media \pm SD de dos réplicas biológicas.

Tabla 1. Tiempo de duplicación de *Anabaena* PCC7120 en concentraciones de saturación en medio acuoso de isómeros del HCH

Tiempo de duplicación (días ⁻¹)	
Control	4.83 \pm 0.76
α -HCH (2 mg/L)	5.52 \pm 1.44 ^{ns}
γ -HCH (7 mg/L)	6.91 \pm 0.77 ^a
β -HCH (5 mg/L)	-
δ -HCH (5 mg/L)	-

Tabla 2. Tiempo de duplicación de *Anabaena* PCC7120 para distintas concentraciones de los isómeros β -HCH y δ -HCH

Tiempo de duplicación (días ⁻¹)	
Control	4.53 \pm 0.41
β -HCH (1 mg/L)	8.89 \pm 0.84 ^b
β -HCH (2 mg/L)	9.50 \pm 0.85 ^b
δ -HCH (1 mg/L)	8.45 \pm 0.67 ^b
δ -HCH (2 mg/L)	9.12 \pm 0.45 ^b

Nota. Se representa la media \pm SD de dos réplicas biológicas: ^{ns} no significativo, ^a P < 0.05, ^b P < 0.01.

Por el contrario, para los isómeros β -HCH y δ -HCH, con una concentración de 5 mg/L, la densidad óptica aumentó ligeramente hasta el día 2 y permaneció constante hasta el día 4, cuando mostró un marcado descenso que indicaba que las concentraciones empleadas eran letales para las cianobacterias. Estos resultados sugerían que la causa más probable de la muerte celular podría ser su metabolismo, pues la densidad óptica del cultivo no descendía hasta el día 4, lo que parecía indicar que inicialmente no eran letales pero a medida que eran metabolizados podrían generarse intermediarios tóxicos o se producía un estrés que ocasionaba la muerte de las cianobacterias.

Puesto que para los isómeros β -HCH y δ -HCH concentraciones correspondientes al límite de solubilidad en agua resultaron letales, se establecieron nuevos cultivos con concentraciones más bajas, concretamente 1 y 2 mg/L. En la Figura 1.B se puede observar que estas concentraciones permitieron el crecimiento de *Anabaena* PCC7120 hasta el día 3, momento en el que se detuvo el crecimiento celular y el cultivo permaneció con una densidad óptica a 750 nm comprendida entre 0.3 y 0.4 hasta el día 10, cuando comenzó a disminuir, sugiriendo que se producía muerte celular. Sin embargo, aunque estas concentraciones permitieron el crecimiento celular los primeros días de cultivo y no ocasionaron una muerte tan temprana como en el caso anterior, se observó que las células se ven más afectadas por los isómeros β -HCH y δ -HCH que por los isómeros α -HCH y γ -HCH (Figura 1.A), que permitieron el crecimiento bacteriano durante todo el ensayo. Además, como se refleja en la Tabla 1.B, el tiempo de duplicación de los cultivos para los isómeros β -HCH y δ -HCH también aumentó considerablemente, sobre todo para una concentración de 2mg/L, sugiriendo así que estos isómeros son peor tolerados por las cianobacterias.

5.2 Estudio de respuestas fisiológicas de *Anabaena* PCC7120 en presencia de isómeros del HCH

Para estudiar los efectos que tenían sobre las células niveles tolerados de los isómeros, se estudiaron distintos aspectos que reflejan cambios notables en la fisiología de las cianobacterias.

5.2.1 Efectos fisiológicos de la presencia de los isómeros α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ -HCH

Se estudiaron los niveles de proteína total y pigmentos fotosintéticos transcurridos 10 días de incubación con los isómeros para ver su efecto en la fisiología de las cianobacterias. Estas mediciones no se pudieron realizar en los cultivos con 5 mg/L de β -HCH y δ -HCH, pues se produjo muerte celular en el día 4.

5.2.1.1. Efectos en los niveles de proteína total soluble

Como se refleja en la Figura 2.A para concentraciones de saturación en medio acuoso los isómeros α -HCH y γ -HCH no afectan a los niveles de proteína total soluble, lo que sugiere que la afectación de la fisiología de las cianobacterias no es alta y justifica que el crecimiento solo se vea ligeramente afectado. En presencia de los isómeros β -HCH y δ -HCH a bajas concentraciones tampoco se observaron cambios significativos (Figura 2.B).

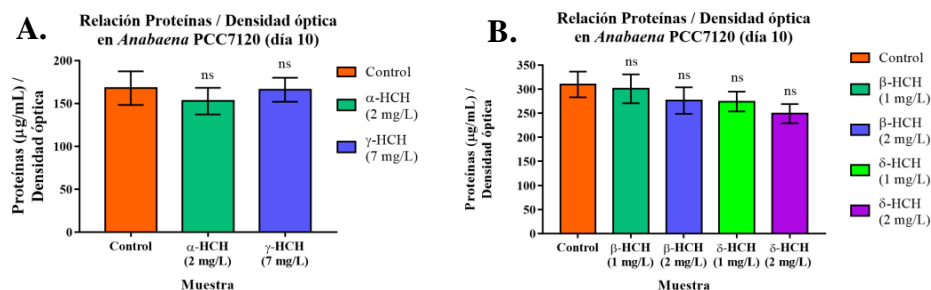


Figura 2. Relación entre la concentración de proteína total ($\mu\text{g/mL}$) y la densidad óptica en *Anabaena* PCC7120 tras 10 días de cultivo en presencia de los isómeros α -HCH (2 mg/L) y γ -HCH (7 mg/L) (A) y diferentes concentraciones de los isómeros β -HCH y δ -HCH (B). **Nota.** Se representa la media \pm SD de dos réplicas biológicas: ^{ns} no significativo

5.2.1.2. Efectos en los niveles de pigmentos fotosintéticos

Puesto que la fotosíntesis es uno de los procesos fisiológicos más importantes de las cianobacterias se estimaron los niveles de clorofila *a*, ficobiliproteínas y carotenoides para ver si la presencia de isómeros del HCH afectaba a los pigmentos fotosintéticos, que son un marcador de estrés celular (28).

5.2.1.2.1. Clorofila *a*

Se observó que los cultivos con los isómeros α -HCH y γ -HCH (concentraciones de 2 y 7 mg/L respectivamente) no mostraban una disminución significativa de los niveles de clorofila *a* (Figura 3.A). La clorofila *a*, así como del resto de los pigmentos fotosintéticos, son un excelente indicador de estrés general ya que la afectación de la maquinaria fotosintética es una de las primeras respuestas a estreses. Por ello el hecho de mantener la clorofila *a* indica que los isómeros son bien tolerados por las cianobacterias.

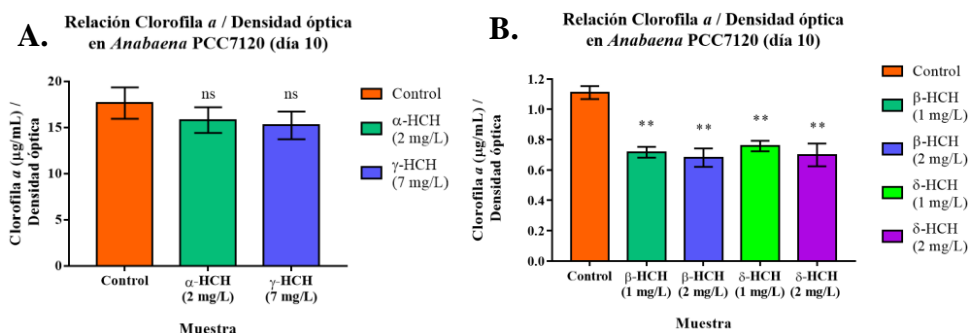


Figura 3. Relación entre la concentración de clorofila *a* ($\mu\text{g/mL}$) y la densidad óptica en *Anabaena* PCC7120 tras 10 días de cultivo en presencia de los isómeros α -HCH (2 mg/L) y γ -HCH (7 mg/L) (A) y diferentes concentraciones de los isómeros β -HCH y δ -HCH (B). **Nota.** Se representa la media \pm SD de dos réplicas biológicas: ns no significativo, ** $P < 0.01$

No obstante en presencia de los isómeros δ -HCH y β -HCH, tanto a 1 como a 2 mg/L sí se produjo una disminución significativa en los niveles de clorofila *a* (Figura 3.B), sugiriendo un detrimento general de la fisiología celular.

5.2.1.2.2. Ficobiliproteínas

La Figura 4 muestra que los niveles de ficobiliproteínas no se ven alterados en presencia de los isómeros α -HCH y γ -HCH pero que sí disminuyen significativamente en presencia de 2 mg/L de β -HCH y 2 mg/L de δ -HCH, lo que podría indicar una afectación de los ficobilisomas debida al propio desmantelamiento de la maquinaria fotosintética como respuesta a estrés o la degradación de las ficobiliproteínas para su empleo como fuente de nitrógeno (29).

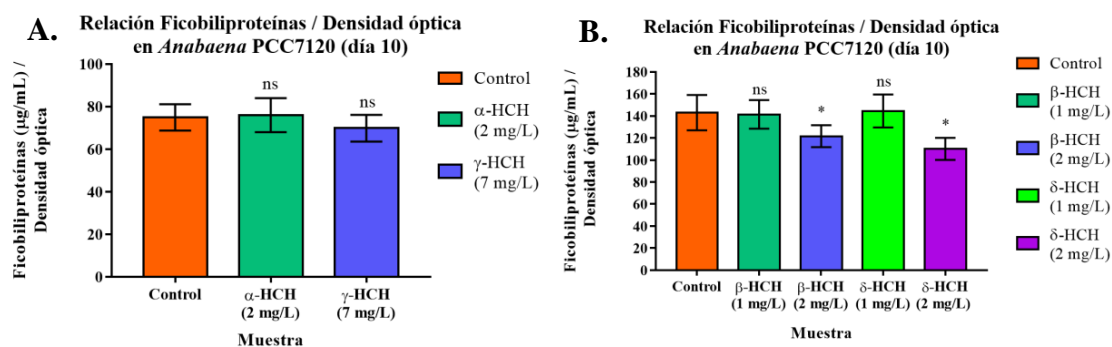


Figura 4. Relación entre concentración de ficobiliproteínas ($\mu\text{g/mL}$) y densidad óptica en *Anabaena* PCC7120 tras 10 días en presencia de los isómeros α -HCH (2 mg/L) y γ -HCH (7 mg/L) (A) y diferentes concentraciones de los isómeros β -HCH y δ -HCH (B). **Nota.** Se representa la media \pm SD de dos réplicas biológicas: ns no significativo, * $P < 0.05$

5.2.1.2.3. Carotenoides

En la Figura 5 se observa que, mientras que en presencia de α -HCH y β -HCH no se producen cambios significativos en los niveles de carotenoides respecto al control, en presencia de γ -HCH y δ -HCH la proporción de carotenoides aumenta significativamente con respecto al control.

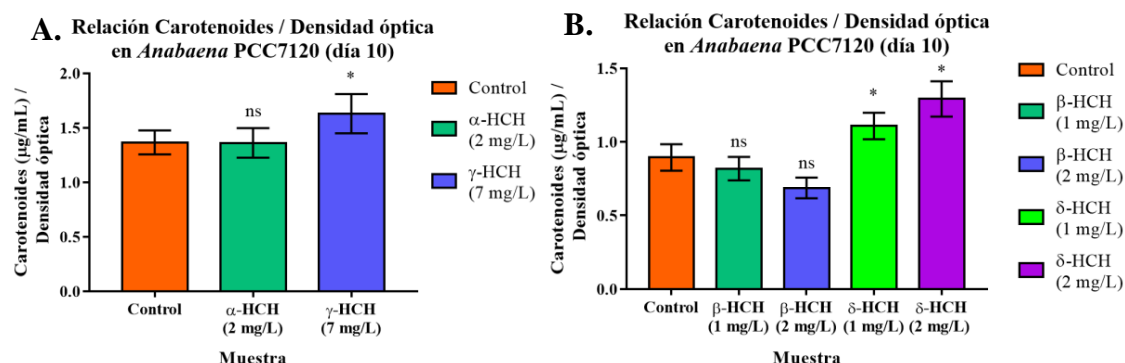


Figura 5. Relación entre concentración de carotenoides ($\mu\text{g/mL}$) y densidad óptica en *Anabaena* PCC7120 tras 10 días de cultivo en presencia de los isómeros α -HCH (2 mg/L) y γ -HCH (7 mg/L) (A) y diferentes concentraciones de los isómeros β -HCH y δ -HCH (B) **Nota.** Se representa la media \pm SD de dos réplicas biológicas: ns no significativo, * $P < 0.05$

Los carotenoides están presentes en las antenas de los fotosistemas y juegan un importante papel en mecanismos de defensa oxidativa. Por ello los resultados sugieren que en presencia de γ -HCH y el δ -HCH, las cianobacterias aumentan las defensas antioxidantes debido a la presencia de radicales libres generados por la presencia y/o degradación de estos isómeros del HCH. En el caso del γ -HCH se sabe que su degradación produce especies reactivas de oxígeno que pueden afectar a la célula (27) mientras que para el caso del δ -HCH se ha propuesto que su ruta de degradación en *S. paucimobilis* implica un intermediario no identificado con efectos similares al 2,4-diclorofenol generado en la metabolización del herbicida 2,4-D (14). Este estrés oxidativo podría ser el causante de la muerte celular observada a altas concentraciones o tiempos prolongados.

5.2.3. Efectos la presencia de α -HCH en la tasa de fotosíntesis neta y respiración

Los ensayos anteriores mostraron que el α -HCH y el γ -HCH no afectaban significativamente al crecimiento y fisiología de *Anabaena* PCC7120 y que por tanto se podía plantear el uso de las cianobacterias para la degradación de estos isómeros. Estudios previos habían analizado la tasa de fotosíntesis neta y la respiración en presencia de lindano (30) y por ello en este trabajo se determinaron estos parámetros tras 48 horas de exposición a 2 mg/L de α HCH. Para ello se midió la cantidad de oxígeno consumido/desprendido con un electrodo de oxígeno de tipo Clark, empleando condiciones de oscuridad para medir la actividad respiratoria e intensidades de luz de 10, 100 y 400 μmol de fotones $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para la actividad fotosintética.

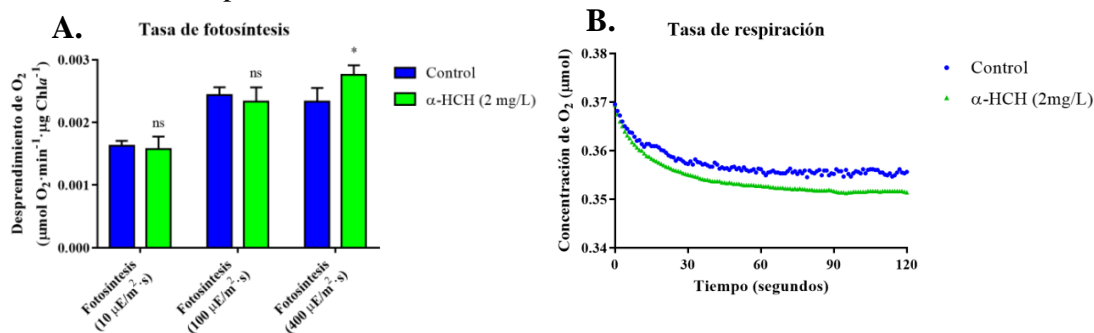


Figura 6. Tasa de fotosíntesis (A) y respiración (B) en *Anabaena* PCC7120 tras 48 horas en presencia de 2 mg/L de α -HCH. **Nota.** Se representa la media \pm SD de tres réplicas biológicas: ns no significativo * $P < 0.05$

En la Figura 6 se puede observar que para intensidades de luz baja y media (10 y 100 μmol de fotones $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ respectivamente) los cambios no eran significativos y el isómero era bien tolerado. No obstante para una intensidad de luz alta de 400 μmol de fotones $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ se observa que la tasa fotosintética neta (fotosíntesis bruta – fotorrespiración) es ligeramente mayor en presencia de 2 mg/L de α -HCH, lo que sugiere una posible respuesta previa frente a estrés oxidativo que permite sobrellevar mejor la fotooxidación que se produce a esta intensidad de luz.

En el caso de la respiración los resultados obtenidos muestran una mayor tasa respiratoria en presencia de α -HCH, que aumenta significativamente ($P < 0.05$) de $1.90 \cdot 10^{-3} \pm 9.59 \cdot 10^{-3}$ μmol de O_2 min^{-1} $\mu\text{g chl } a^{-1}$ en el control a $2.19 \cdot 10^{-3} \pm 3.66 \cdot 10^{-3}$ μmol de O_2 min^{-1} $\mu\text{g chl } a^{-1}$ en presencia del isómero. Este hecho es muy interesante, pues aunque se ha descrito que la luz es imprescindible para la declorinación del isómero γ -HCH (19) los resultados permiten pensar que tal vez el α -HCH puede ser degradado hasta CO_2 y H_2O o que hay una mayor producción de ATP para llevar a cabo procesos de detoxificación.

5.2.4. Cambios en la expresión de los genes *cat* y *prxA* en presencia de α -HCH

Dado que trabajos previos habían sugerido que la exposición a isómeros del HCH podía inducir estrés oxidativo (14) y que una posible explicación para la mayor tasa fotosintética descrita en este trabajo podía ser que los mecanismos de defensa oxidativa estuvieran potenciados en presencia de α -HCH se consideró interesante estudiar también cambios en la expresión de los genes *prxA* (*alr4641*), que codifica para una peroxirredoxina, y *cat* (*alr0998*) que codifica para una catalasa y que están implicados en la respuesta frente a estrés oxidativo. En trabajos anteriores se había demostrado que el DMSO no afectaba a la expresión de estos genes (27) y solo se consideraron cambios significativos en la expresión si el ratio era superior a ± 2 .

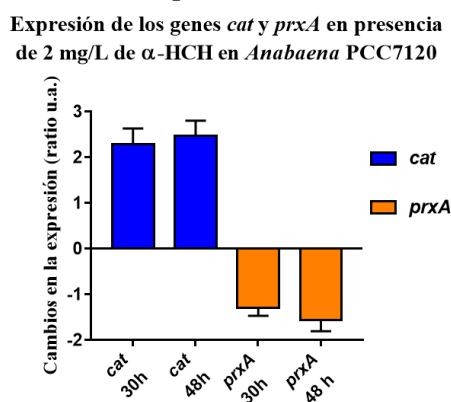


Figura 7. Cambio en los niveles de expresión de los genes *cat* y *prxA* en *Anabaena* PCC7120 tras 48 horas de exposición a 2 mg/L de α -HCH. **Nota.** Se representa la media \pm SD de tres réplicas biológicas.

Como muestra la Figura 7 para la peroxirredoxina no se observaron cambios significativos en la expresión, pues se produjo una disminución de -1.3 a las 30 horas y -1.6 a las 48 horas. En el caso de la catalasa se observó una inducción de 2.3 a las 30 horas y de 2.5 a las 48 horas, lo que indicaba que la presencia y/o degradación de α -HCH desencadena una respuesta frente a estrés oxidativo y por tanto podría explicar el aumento de la tasa fotosintética para intensidades de luz altas en las que se produce fotooxidación. Además esto indica que el α -HCH produce estrés oxidativo, tal y como sucedía en el caso del γ -HCH (31). En estos trabajos se vio que el γ -HCH daba lugar a una mayor expresión de genes de respuesta frente a estrés oxidativo como la peroxirredoxina y se propuso que una mayor tolerancia a este fenómeno podría mejorar la tolerancia y degradación de los isómeros del HCH.

5.3. Evolución de la concentración de los isómeros α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ -HCH en presencia de *Anabaena* PCC7120

En estudios previos se había sugerido que *Anabaena* PCC7120 podía degradar lindano o γ -HCH (18) y trabajos realizados en nuestro grupo de investigación habían iniciado estudios sobre la capacidad de esta cianobacteria de degradar γ -HCH y α -HCH (20, 27). Sin embargo los resultados de estos últimos estudios no habían sido concluyentes, pues los controles de degradación mostraban que se producía una evaporación considerable de estos isómeros.

Experimentos previos no incluidos en esta memoria sirvieron para poner de manifiesto que la solubilidad de los isómeros del HCH era menor de la esperada debido a la baja pureza de los productos comerciales y a que se producía evaporación de los mismos, lo que hacía necesario cubrir los erlenmeyers con parafilm. Además se había descrito que el medio BG11 conteniendo amonio no era apropiado para estudiar la degradación de isómeros del HCH (19) y por tanto para estos estudios era necesario usar medio BG11 modificado.

Se estudió la capacidad de *Anabaena* PCC7120 cultivada en medio BG11 modificado de llevar a cabo una potencial degradación de α -HCH a una concentración de 2 mg/L y de γ -HCH a una concentración de 7 mg/L, es decir empleando concentraciones correspondientes al límite de solubilidad en agua, pues los estudios de tolerancia habían demostrado que apenas afectaban a la fisiología de las cianobacterias (ver Figura 1.A)

Se comparó la concentración de los isómeros en presencia de cianobacterias con la concentración de isómeros en el control tras 1, 3 y 6 días de exposición y se observó que para ambos isómeros se producía una disminución significativa a partir del tercer día y que al sexto día que se producía prácticamente la desaparición total, pues la concentración de α -HCH y γ -HCH en presencia de cianobacterias era menor del 0,5% de la concentración inicial (Figuras 9.A y 9.B).

Asimismo se observó que la velocidad de degradación era mayor para el α -HCH que para el γ -HCH, pues al tercer día la concentración de α -HCH en presencia de cianobacterias era un 10% de la concentración en el control y un 6,5% de la inicial mientras que para ese mismo tiempo la concentración de γ -HCH en el cultivo de *Anabaena* PCC7120 era un 40% de la concentración en el control y un 49% de la concentración inicial.

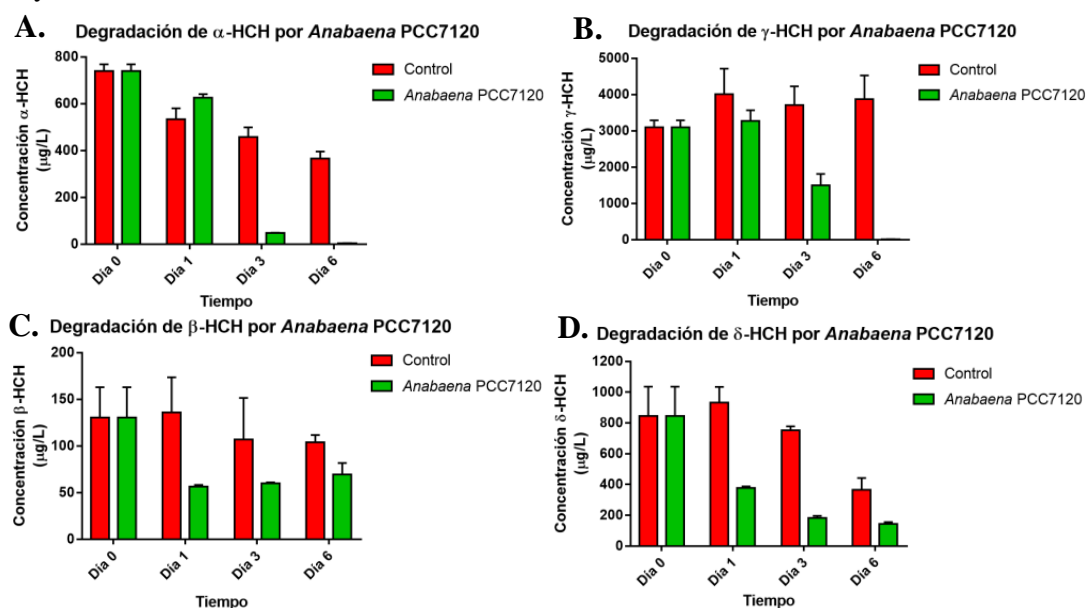


Figura 9. Análisis de la degradación de los isómeros α -HCH (A), γ -HCH (B), β -HCH (C) y δ -HCH (D) por *Anabaena* PCC7120 **Nota.** Se representa la media \pm SD de dos réplicas biológicas.

No obstante se comprobó que, pese a cubrir los erlenmeyers con parafilm se había producido una cierta disminución en el caso del α -HCH, lo que probablemente se deba a que la constante de volatilidad de Henry de este isómero, que describe la volatilidad de una sustancia en una fase acuosa, es la más alta de los cuatro isómeros estudiados, con un valor de $0.870 \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$ (32) o a que es más sensible a la fotodegradación.

Por último se estudió la evolución de la concentración de los isómeros que más afectaban a la fisiología de las cianobacterias, el β -HCH y el δ -HCH. En el caso del δ -HCH las células se cultivaron con una concentración de 2 mg/L del isómero que, ya que los estudios de tolerancia demostraron que mantenía vivas las células de *Anabaena* PCC7120 (ver Figura 1.B). Para el β -HCH se utilizó una concentración de 8 mg/L del isómero. La razón de emplear una concentración tan alta se debe a que en experimentos previos no mostrados solo se solubilizó un 2,5% de la concentración añadida y al añadir β -HCH para obtener una concentración 2 mg/L solo se obtenía una concentración de 50 $\mu\text{g/L}$, demasiado baja como para estudiar la evolución de la concentración de este isómero.

La concentración empleada es bastante elevada y superior a la de 5 mg/L ensayada en los estudios de tolerancia que, pese a ocasionar la muerte de las cianobacterias, permitía el crecimiento bacteriano durante los primeros días de cultivo (ver Figura 1.A). Por ello era posible estudiar la potencial degradación de β -HCH a concentraciones elevadas, ya que solo interesaba conocer si *Anabaena* PCC7120 era capaz de reducir los niveles de este isómero en solución.

Los resultados obtenidos indicaron que para el δ -HCH la degradación inicial es bastante rápida, pues el día 1 la concentración del isómero en el sobrenadante disminuía hasta un 44% de la inicial, pero luego se detenía y el día 6 todavía quedaba un 16% de la cantidad añadida inicialmente. Por tanto, a diferencia de lo que sucedía con los isómeros anteriores, el δ -HCH no es eliminado por completo en las condiciones ensayadas (Figura 9.C). Probablemente esto se debe a que al igual que sucede en otros microorganismos, el metabolismo de este isómero genera intermediarios tóxicos que ralentizan el crecimiento o producen la muerte de las células y por tanto impiden la desaparición completa de este isómero (14).

En el caso del β -HCH, el uso de una concentración más elevada mostró que el producto comercial proporcionado por la casa Sigma Aldrich estaba contaminado con cantidades significativas de otros isómeros del HCH, lo que explicaba la baja solubilidad que aparentemente se obtenía para este isómero. No obstante, los resultados mostraron que *Anabaena* PCC7120 parecía capaz de degradar parcialmente el isómero β -HCH, pues el día 1 la concentración en presencia de cianobacterias disminuía hasta un 45% de la inicial y se mantenía así hasta el final del experimento (Figura 9.D). Esto sugiere que el isómero β no puede ser degradado por completo y que la acumulación de los intermediarios impide que las cianobacterias puedan continuar con su degradación.

Además, puesto que el producto estaba contaminado con otros isómeros del HCH, se pudo corroborar que *Anabaena* PCC7120 era capaz de eliminar su totalidad los isómeros α -HCH, γ -HCH del sobrenadante y que también podía degradar totalmente el δ -HCH si se encontraba en baja concentración, pues en presencia de cianobacterias la concentración de los isómeros contaminantes disminuía hasta alcanzar valores por debajo del límite de detección el día 1 (Tabla S-7, sección 8.5 de Material Suplementario).

Los valores numéricos de la concentración de isómeros en los sobrenadantes se recogen en la sección 8.5 de Material Suplementario.

5.4. Análisis de la expresión de genes homólogos a los genes *linB* y *linE* en presencia de α -HCH

Gracias a estudios de genómica comparativa se habían localizado dos posibles genes *lin* en el genoma de *Anabaena* PCC7120, los genes *all0193* y *all0352*, que presentaban homología con los genes *linB* (haloalcano dehalogenasa) y *linE* (clorohidroquinona/hidroquinona 1,2-dioxigenasa) de *S. paucimobilis* respectivamente (31). Puesto que en *S. paucimobilis* el gen *linE* se induce en presencia de lindano (14) y en el genoma de *Anabaena* PCC7120 también se había encontrado un gen homólogo al gen *linR* de *S. paucimobilis*, que codifica para el regulador transcripcional de la ruta y que se encontraba orientado de forma divergente con respecto al gen homólogo a *linE*, estudios previos habían analizado la expresión de estos genes en *Anabaena* PCC7120 en presencia de lindano y α -HCH (27, 31). En estos estudios las cianobacterias se habían cultivado en medio BG11 conteniendo amonio, que demostró no ser apropiado para estudiar la degradación de isómeros del HCH. Además habían sido realizados para tiempos cortos pero los resultados de este estudio sugerían que durante las primeras 24 horas de exposición no se producía una degradación significativa de los isómeros α -HCH y γ -HCH, y que por ello era más interesante estudiar estas respuestas a tiempos más largos. Puesto que estudios recientes habían analizado la expresión de estos genes a las 48 horas en presencia de lindano (30) en este trabajo se decidió estudiar cambios en su expresión en presencia de α -HCH, pues este isómero también era degradado en su totalidad por las cianobacterias y los estudios de tolerancia mostraban que no era letal para *Anabaena* PCC7120 y permitían su crecimiento. Trabajos anteriores habían demostrado que el DMSO no afectaba a la expresión de estos genes (27) y solo se consideraron cambios significativos en la expresión si el ratio era superior a ± 2

Expresión de los genes *linB* y *linE* en presencia de 2 mg/L de α -HCH en *Anabaena* PCC7120

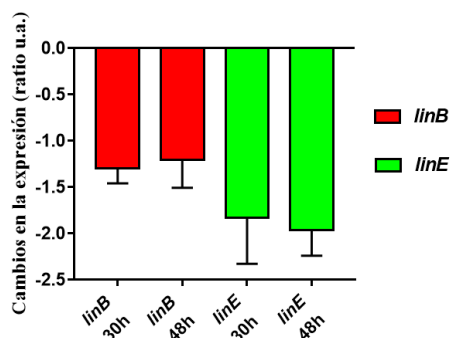


Figura 10. Cambio en los niveles de expresión de los genes *linB* y *linE* en *Anabaena* PCC7120 tras 48 horas de exposición a 2 mg/L de α -HCH. **Nota.** Se representa la media \pm SD de tres réplicas biológicas.

Los resultados obtenidos (Figura 10) mostraron que ninguno de los potenciales genes implicados en la degradación de isómeros de HCH, *linB* o *linE*, se inducían ni a las 30 ni a las 48 horas de exposición a 2 mg/L de α -HCH, pues no se producían cambios significativos en su expresión. Para *linB* se observaba una disminución en la expresión de -1.3 a las 30 horas y -1.2 a las 48 horas mientras que para *linE* se observaba una disminución de -1.8 a las 30 horas y -1.9 a las 48 horas. Esto sugiere que la ruta de degradación de este isómero difiere con respecto a la de *S. paucimobilis*, bien porque participan genes diferentes o bien porque se forman intermediarios distintos, pues en esta especie el gen *linE* se induce en presencia de α -HCH (14). Otra posibilidad sería que el gen sí participara en la degradación de isómeros del HCH pero no fuera inducible, de modo que su expresión basal permitiría la degradación de estos compuestos.

5.5. Identificación de genes potencialmente implicados en la degradación de isómeros del HCH en *Anabaena* PCC7120 mediante estudios bioinformáticos

Los ensayos realizados sugerían que *Anabaena* PCC7120 podía degradar los isómeros γ -HCH y α -HCH prácticamente en su totalidad y los isómeros β -HCH y δ -HCH parcialmente. Sin embargo la ruta de degradación de isómeros del HCH en esta cianobacteria todavía no ha sido caracterizada. Puesto que una ruta degradativa había sido descrita en *S. paucimobilis* (14), estudios de genómica comparativa realizados previamente (31) permitieron identificar el genoma de *Anabaena* PCC7120 los genes *all0193*, *all0352* y *alr0353* como tres potenciales genes *lin*, pues presentaban homología con los genes *linB*, *linE* y *linR* de *S. paucimobilis*, respectivamente.

Sin embargo estos estudios no permitieron identificar homólogos para los genes *linA* (hexaclorociclohexano declorinasa), *linC* (2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol dehidrogenasa), y *linD* (2,5-diclorohidroquinona declorinasa). Esto llevó a pensar que parte de los genes de la ruta de degradación de isómeros del HCH en *Anabaena* PCC7120 podían tener una baja identidad con los genes de *S. paucimobilis* o que existiera una ruta alternativa, y por tanto que no fuera posible identificarlos por homología de secuencias.

Con la intención de caracterizar la ruta de degradación de HCH en *Anabaena* PCC7120 se trataron de identificar genes implicados en la degradación de este tipo de compuestos mediante la búsqueda en la base de datos 'Cyanobase' de genes anotados como hexaclorociclohexano declorinasa, 2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol dehidrogenasa o 2,5-diclorohidroquinona declorinasa. Para los genes *linA* y *linD* no se obtuvo ningún resultado pero en el caso de *linC* sí que se identificaron genes anotados como 2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol dehidrogenasa en *Synechococcus* sp. CC9311, *Synechococcus* sp. WH 8020 y *Cyanothece* sp. CCY0110, a partir de los cuales se pudo localizar mediante BlastP el gen *all3836* en el genoma de *Anabaena* PCC7120 como un posible gen *linC*, pues presentaba una identidad superior al 50% con respecto a estas tres secuencias.

En primer lugar se quiso determinar si esta hipotética proteína LinC presentaba o no homología con la proteína LinC de *S. paucimobilis* para así saber si podía ser un buen candidato a participar en la ruta de degradación de isómeros del HCH. Para ello se llevó a cabo un alineamiento de secuencias empleando la matriz de sustitución BLOSUM62 (sección 8.6.1 de Material suplementario) que mostró que las secuencias presentaban una identidad del 30,3% y una similitud del 47,6% y por tanto permitía determinar, en base a los criterios establecidos por el instituto RostLab (33), la existencia de homología entre estas dos secuencias

También se quería averiguar si este hipotético gen *linC* estaba presente en otras especies cianobacterias y comparar las secuencias de las proteínas entre sí, pues en caso de tener la misma función que los genes anotados como 2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol dehidrogenasa y tratarse de organismos filogenéticamente cercanos las proteínas identificadas deberían presentar una similitud considerable en su secuencia. Así, se buscaron otros posibles genes *linC* en cianobacterias siguiendo la misma estrategia que para *Anabaena* PCC7120 y se realizó un alineamiento múltiple de secuencias que mostró que la secuencia de interés presentaba una alta similitud con el resto de secuencias y contenía regiones altamente conservadas en el resto de proteínas LinC (sección 8.6.2 de Material suplementario). En base a este alineamiento múltiple se construyó también un árbol filogenético que permitió determinar que la secuencia filogenéticamente más cercana a la proteína codificada por el gen *all3836* de *Anabaena* PCC7120 era la de *Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505 y que ambas compartían un ancestro común con la proteína LinC de *S. paucimobilis* (sección 8.7 de material suplementario)

Por último se realizó un modelado por homología de esta proteína para comprobar si además de similitud a nivel de secuencia presentaba homología estructural con la proteína LinC de *S. paucimobilis*. Aunque la estructura tridimensional de la proteína LinC de *S. paucimobilis* no ha sido resuelta experimentalmente sí que ha sido modelada en base a la estructura de la ciclohexanol deshidrogenasa de *Aromatoleum aromaticum* (PDB: 4URE) y el modelo ha sido depositado en ‘Swiss-Model Repository’ de modo que, empleando el servidor ‘SwissModel’, se construyó un modelo de la proteína codificada por el gen *all3836* de *Anabaena* PCC7120 basado en la estructura de la glucosa deshidrogenasa de *Bacillus megaterium* (PDB: 1GCO) y se comparó con la estructura propuesta para la proteína LinC de *S. paucimobilis*.

La comparación de las estructuras tridimensionales predichas mostró una alta similitud entre las dos proteínas, pues se obtuvo que el RMSD entre ambas estructuras era de 0.623 Å y que la disposición de motivos de estructura secundaria y la superficie de ambas proteínas era prácticamente idéntica (Figura 11.A), lo que indicaba que era bastante probable que la proteína propuesta pudiera participar en la ruta de degradación de isómeros del HCH. Además se observó que en ambos casos el centro activo presentaba una conformación similar y que los residuos que forman parte de la triada catalítica Lys-Ser-Tyr, necesaria para que pueda tener lugar la catálisis (13), presentaban una disposición prácticamente idéntica (Figura 11.B y 11.C).

Finalmente, para ver si era probable que las estructuras propuestas pudieran catalizar la reacción de dehidrogenación se llevó a cabo una simulación de acoplamiento molecular del modelo de la estructura de ambas enzimas con los sustratos de la reacción, el NAD⁺ y el 2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol, que mostró que ambos sustratos encajaban en el centro activo de las enzimas y tenían una disposición similar, indicando así que los modelos propuestos eran razonables y que la hipotética proteína codificada por el gen *all3836* de *Anabaena* PCC7120 tenía una gran probabilidad de tener la misma función que la proteína LinC de *S. paucimobilis* (Figura 12).

En base a estos resultados se pudo proponer que el gen *all3836* de *Anabaena* PCC7120 podría codificar para una proteína con actividad 2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol deshidrogenasa y podría intervenir en la ruta de degradación de isómeros del HCH.

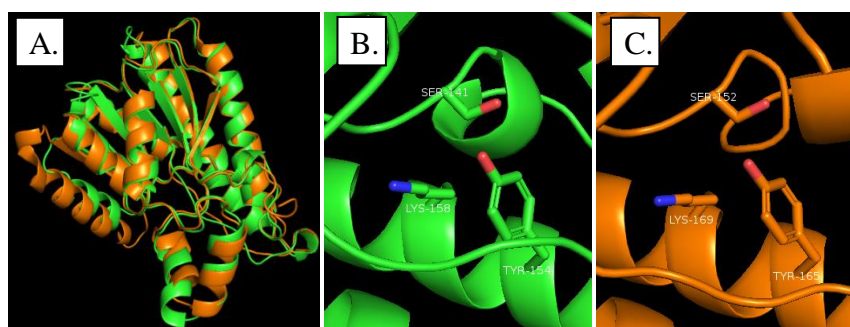


Figura 11. Comparación de las estructuras tridimensionales modeladas para la proteína LinC de *S. paucimobilis* (verde) y para la proteína homóloga en *Anabaena* PCC7120 (naranja) (A), detalle de la tríada catalítica en la proteína de *S. paucimobilis* (B) y en la proteína de *Anabaena* PCC7120 (C)

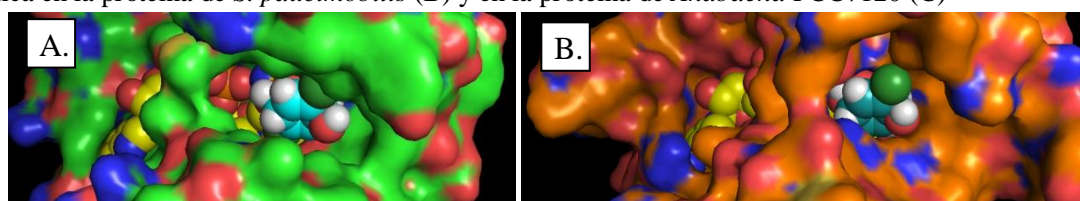


Figura 12. Resultado del docking de la proteína LinC de *S. paucimobilis* (A) y de la proteína homóloga en *Anabaena* PCC7120 (B) con sus sustratos, el NAD⁺ (amarillo) y el 2,5-DDOL (cian).

5.7. Discusión global

En este trabajo se ha iniciado el estudio de la capacidad de degradación de isómeros del HCH por *Anabaena* PCC7120. Esta cianobacteria modelo ha presentado una buena tolerancia a los isómeros del HCH, sugiriendo que estos microorganismos son buenos candidatos para la biorremediación de este compuesto. La tolerancia es más alta para los isómeros α -HCH y γ -HCH, pues concentraciones correspondientes al límite de solubilidad en agua apenas afectan al crecimiento y a los niveles de pigmentos fotosintéticos. Por el contrario para los isómeros β -HCH y δ -HCH la tolerancia es menor, ya que concentraciones de saturación en medio acuoso ocasionan la muerte de las células. Además una disminución de la concentración a valores de 1 y 2 mg/L no impide que se vean afectados el crecimiento y fisiología de las cianobacterias. Esto implica que para garantizar la viabilidad de las cianobacterias son necesarias bajas concentraciones de estos dos isómeros, lo cual no supondría un grave problema en aguas contaminadas con residuos industriales pues en estos ambientes los niveles de β -HCH y δ -HCH oscilan entre el 5 y el 12% del total de isómeros, y los isómeros mayoritarios son el α -HCH y el γ -HCH, que son mejor tolerados por las cianobacterias (12). En general, los parámetros fisiológicos no se ven muy afectados para las concentraciones de isómeros estudiadas, aunque se observan respuestas de estrés oxidativo como son aumento de carotenoides en presencia de γ -HCH y δ -HCH e inducción de la expresión de catalasa y de la flavodoxina (resultados no mostrados) en presencia de α -HCH.

El género *Anabaena* parece ser bastante prometedor, pues los ensayos se han realizado con concentraciones correspondientes al límite de solubilidad en agua y en el medio ambiente las concentraciones no serían tan altas. En vertederos el problema es más complejo, pues los isómeros del HCH están mezclados con disolventes orgánicos que aumentan su solubilidad y hacen que la biorremediación sea más difícil, pero en aguas continentales los valores previstos entrarían en el rango de tolerancia de la cianobacteria (34). Asimismo si las concentraciones de isómeros no son letales también se puede plantear la biorremediación en balsas de agua para aprovechar la biomasa producida.

Los ensayos de degradación muestran que los isómeros α -HCH y γ -HCH prácticamente desaparecen por completo en presencia de *Anabaena* PCC7120 y los isómeros β -HCH y δ -HCH desaparecen parcialmente. Todo parece indicar que los distintos isómeros son incorporados al metabolismo de la cianobacteria, aunque sería necesario analizar la presencia de intermediarios de la ruta de degradación en el interior celular, de forma análoga a estudios previos en los que se determinó la presencia de 1,2,4-triclorobenceno y que sirvieron para proponer que *Anabaena* PCC7119 degradaba lindano, al menos parcialmente (18).

La identificación de los intermediarios también permitiría reconstruir la ruta de degradación. El hecho de no encontrar inducidos los genes homólogos a los genes *linB* y *linE* de *S. paucimobilis*, pese a la existencia de un homólogo del regulador transcripcional *linR*, puede ser debido a factores críticos en los ensayos de RT-PCR, como la ventana de tiempo o la dosis de compuesto, o a que la expresión basal sea suficiente para permitir la degradación de isómeros del HCH. Sin embargo una posibilidad sería que la degradación del HCH en *Anabaena* PCC7120 se produjera por una ruta alternativa, pues los estudios de genómica comparativa no encontraron genes homólogos a *linA*, *linD* o *linF* que en *S. paucimobilis* son esenciales para la degradación. Además en *Anabaena* para la dechlorinación es esencial la presencia de un operón *nir* funcional (nitrato y nitrito reductasa, entre otros) (19), que podría estar reemplazando la función de *linA*, pues se observó que si el gen *linA* se expresa en *Anabaena* aumenta la degradación de γ -HCH (18).

En *S. paucimobilis* solo el γ -HCH puede ser degradado hasta CO₂ y H₂O (15). Aunque se desconoce la ruta de degradación de isómeros del HCH en *Anabaena* PCC7120, los ensayos realizados para el α -HCH muestran que se incrementa la respiración celular, sugiriendo que en esta cianobacteria el isómero α -HCH podría ser degradado por completo. Además en *S. paucimobilis* los genes *linD* y *linE* se inducen en presencia de α -HCH y γ -HCH por un intermediario de la ruta de degradación, el 2,5-DDOL (14). Este compuesto es el producto de la enzima LinC, para la cual se ha encontrado un posible gen homólogo en *Anabaena* PCC7120 mediante estudios bioinformáticos. Puesto que en este trabajo no hay inducción del gen homólogo a *linE*, podría ser que el posible gen homólogo a *linC* no actuara de la misma forma que en *Sphingomonas* o que los isómeros del HCH se degradasen por una ruta diferente, dando lugar a otros intermediarios que no fueran capaces de inducir estos genes. Por ello en el futuro se plantea realizar estudios de transcriptómica en presencia de isómeros del HCH, para encontrar posibles genes implicados en la degradación de este compuesto, así como analizar los metabolitos presentes en el interior celular para describir la ruta de degradación.

6. Conclusiones

Tras la realización del estudio se obtienen las siguientes conclusiones:

- *Anabaena* PCC7120 es un organismo adecuado para plantear biorremediación de los isómeros α -HCH y γ -HCH pero es menos apropiado para los isómeros β -HCH y δ -HCH pues no son eliminados en su totalidad y son peor tolerados.
- En presencia de α -HCH se observan respuestas frente a estrés oxidativo que podrían estar implicadas en la mayor tolerancia a este isómero y una mayor tasa respiratoria que podría deberse a su degradación hasta CO₂ y H₂O.
- Los estudios de expresión génica muestran que, a las concentraciones estudiadas, la presencia y potencial degradación de α -HCH no induce la expresión de genes homólogos a los genes *lin* de *Sphingomonas*, indicando la existencia de diferencias en la ruta de degradación.
- Los estudios bioinformáticos permiten proponer el gen *all3836* como miembro de la ruta de degradación de isómeros del HCH en *Anabaena* PCC7120 y sugieren la existencia de una ruta alternativa a la de *S. paucimobilis* para la degradación de isómeros del HCH.

Conclusions

After finishing this study the following conclusions have been obtained:

- *Anabaena* PCC7120 is an organism fit for posing biorremediation of α -HCH and γ -HCH isomers but is less appropriated for β -HCH and δ -HCH as they are not wholly eliminated and are worse tolerated.
- In the presence of α -HCH oxidative stress responses have been noted, which could be involved in a better tolerance towards this isomer and a bigger respiration rate which could be caused by its degradation to CO₂ and H₂O.
- Studies on genic expression show that homologous genes to *Sphingomonas lin* genes are not induced in the presence of α -HCH in the studied concentrations, pointing to the existence of differences in the degradation pathway.
- Bioinformatic studies allow for proposing gene *all3836* as a member of HCH isomers degradation pathway in *Anabaena* PCC7120, and suggest the existence of an alternative pathway different to that of *S. paucimobilis*.

Bibliografía

1. Whitton B, Potts M. The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space. Kluwer Academic Publishers; 2002.
2. Sukenik A, Zohary T, Padisák J. Cyanoprokaryota and Other Prokaryotic Algae. Encyclopedia of Inland Waters. 2009;:138-148.
3. Singh R, Parihar P, Singh M, Bajguz A, Kumar J, Singh S et al. Uncovering Potential Applications of Cyanobacteria and Algal Metabolites in Biology, Agriculture and Medicine: Current Status and Future Prospects. Frontiers in Microbiology. 2017;8.
4. Megharaj M, Madhavi D, Sreenivasulu C, Umamaheswari A, Venkateswarlu K. Biodegradation of methyl parathion by soil isolates of microalgae and cyanobacteria. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 1994;53(2).
5. Megharaj M, Venkateswarlu K, Rao AS. Metabolism of monocrotophos and quinalphos by algae isolated from soil. Bull Environ Contam Toxicol. 1987;39(2):251-6.
6. Dubey S, Dubey J, Mehra S, Tiwari P, Bishwas A. Potential use of cyanobacterial species in bioremediation of industrial effluents. African Journal of Biotechnology. 2011;10(7):1125-1132.
7. Li YF. Global technical hexachlorocyclohexane usage and its contamination consequences in the environment: from 1948 to 1997. Sci Total Environ 1999;232:121–58.
8. Breivik K, Pacyna JM, Münch J. Use of alpha-, beta- and gamma-hexachlorocyclohexane in Europe, 1970-1996. Sci Total Environ. 1999;239(1-3):151-63.
9. Nayyar N, Sangwan N, Kohli P, Verma H, Kumar R, Negi V et al. Hexachlorocyclohexane: persistence, toxicity and decontamination. Reviews on Environmental Health. 2014;29(1-2):49-52.
10. Sharma H, Zhang P, Barber DS, Liu B. Organochlorine pesticides dieldrin and lindane induce cooperative toxicity in dopaminergic neurons: role of oxidative stress. Neurotoxicology. 2010;31(2):215-22.
11. Nolan K, Kamrath J, Levitt J. Lindane toxicity: a comprehensive review of the medical literature. Pediatr Dermatol. 2012;29(2):141-6.
12. Rodríguez Garrido B. Movilidad, biodisponibilidad y degradación inducida de isómeros de Hexaclorociclohexano (HCH) en suelos contaminados. Santiago de Compostela: Universidade de Santiago de Compostela, Servizo de Publicacións e Intercambio Científico; 2009.
13. 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. 2010;74(1):58-80.
14. Suar M, van der Meer JR, Lawlor K, Holliger C, Lal R. Dynamics of multiple *lin* gene expression in *Sphingomonas paucimobilis* B90A in response to different hexachlorocyclohexane isomers. Appl Environ Microbiol. 2004;70(11):6650-6.
15. Verma H, Kumar R, Oldach P, Sangwan N, Khurana JP, Gilbert JA, et al. Comparative genomic analysis of nine Sphingobium strains: insights into their evolution and hexachlorocyclohexane (HCH) degradation pathways. BMC Genomics. 2014;15:1014.
16. El-Bestawy EA, El-Salam AZA, Mansy AE-RH. Potential use of environmental cyanobacterial species in bioremediation of lindane-contaminated effluents. International Biodeterioration & Biodegradation. 2007;59(3):180-92.

17. Kuritz T. Cyanobacteria as agents for the control of pollution by pesticides and chlorinated organic compounds. *J Appl Microbiol.* 1998;85 Suppl 1:186S-192S.
18. Kuritz T, Wolk CP. Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic pollutants. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61(1):234-8.
19. Kuritz T, Bocanera LV, Rivera NS. Dechlorination of lindane by the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120 depends on the function of the *nir* operon. *J Bacteriol.* 1997;179(10):3368-70.
20. Bueno M, Fillat MF, Strasser RJ, Maldonado-Rodríguez R, Marina N, Smienk H, et al. Effects of lindane on the photosynthetic apparatus of the cyanobacterium *Anabaena*: fluorescence induction studies and immunolocalization of ferredoxin-NADP⁺ reductase. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2004;11(2):98-106.
21. Ceballos-Laita L, Calvo-Begueria L, Lahoz J, Bes M, Fillat M, Peleato M. γ -Lindane Increases Microcystin Synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Marine Drugs.* 2015;13(9):5666-5680.
22. Rippka R. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods in Enzymology.* 1988;167:3-27.
23. Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology.* 1979;111(1):1-61.
24. Marker AFH. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biology.* 1972;2(4):361-85.
25. Bryant D, Glazer A, Eiserling F. Characterization and structural properties of the major biliproteins of *Anabaena* sp. *Archives of Microbiology.* 1976;110(1):61-75.
26. Taylor RF, Davies BH. Triterpenoid carotenoids and related lipids. Triterpenoid carotenoid aldehydes from *Streptococcus faecium* UNH 564P. *Biochem J.* 1976;153(2):233-9.
27. Abizanda, S. Estudio de la degradación de isómeros de lindano en muestras complejas procedentes de Bailín. Trabajo Fin de Grado. Repositorio Facultad de Ciencias. 2017
28. Yancheva S, Georgieva L, Kostova M, Halkoglu P, Dimitrova M, Naimov S. Plant Pigments Content as a Marker for Herbicide Abiotic Stress in Corn (*Zea mays* L.). *Emirates Journal of Food and Agriculture.* 2016;28(5):332.
29. Liotenberg S, Campbell D, Rippka R, Houmard J, de Marsac N. Effect of the Nitrogen Source on Phycobiliprotein Synthesis and Cell Reserves in A Chromatically Adapting Filamentous Cyanobacterium. *Microbiology.* 1996;142(3):611-622.
30. Abizanda, S. Caracterización de la cianobacteria *Anabaena* PCC7120 como potencial biorremediador de lindano: respuesta fisiológica y transcripcional y aplicación a muestras reales. Trabajo Fin de Máster. Repositorio Facultad de Ciencias. 2018
31. Castro C. Estudio de la respuesta al γ -lindano en cianobacterias: cambios transcripcionales de genes potencialmente implicados. Trabajo Fin de Grado. Repositorio Facultad de Ciencias. 2016
32. Suntio LR, Shiu WY, Mackay D. A review of the nature and properties of chemicals present in pulp mill effluents. *Chemosphere.* 1988;17(7):1249-90.
33. Rost B. Protein structures sustain evolutionary drift. *Fold Des.* 1997;2(3):S19-24.
34. Fernández J, Arjol M, Cacho C. POP-contaminated sites from HCH production in Sabiñánigo, Spain. *Environmental Science and Pollution Research.* 2013;20(4):1937-1950.
35. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.

Material suplementario:

8. Material suplementario

8.1. Ruta de degradación de γ -HCH en *Sphingomonas paucimobilis* UT26

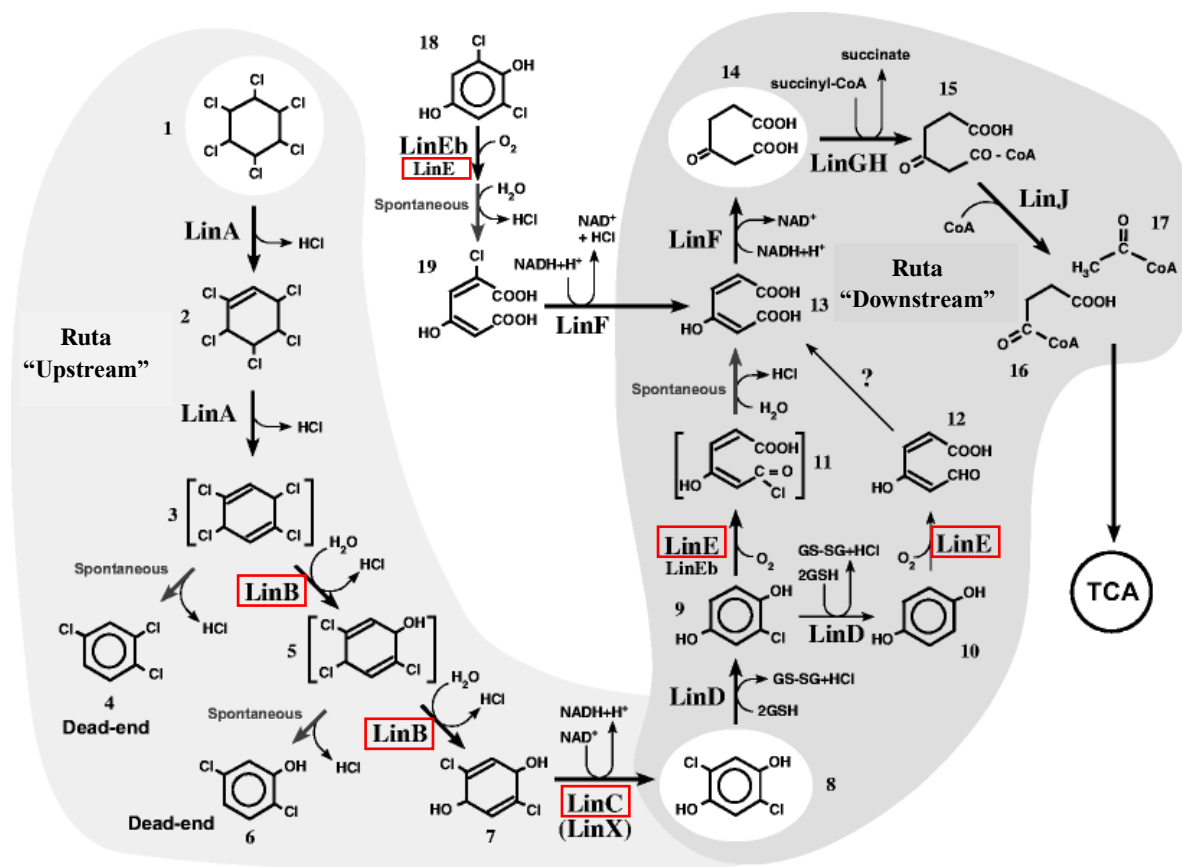


Figura S-1. Ruta de degradación de γ -HCH en *Sphingomonas paucimobilis* UT26 (adaptado de Nagata et al., 2007). Las proteínas para las que se han encontrado homólogos en *Anabaena* PCC7120 aparecen recuadradas.

8.2. Calibración del electrodo de oxígeno

Antes de realizar medidas es necesario montar el electrodo y calibrarlo, obteniendo unos parámetros de calibración adecuados. Para el montaje del electrodo se añaden unas gotas de KCl 2 M sobre el ánodo y el cátodo y se cubren de forma sucesiva con una lámina de papel y con una membrana PTFE de teflón permeable a oxígeno, que se fijan con aros de goma. De esta manera el ánodo y el cátodo quedan comunicados por un puente de disolución de KCl. Si el montaje del electrodo es correcto se debe observar un voltaje inicial de 4095 mV, que va bajando lentamente hasta llegar a los 1800-2100 mV.

Una vez montado el electrodo hay que calibrar el sensor de luz siguiendo las indicaciones del programa O₂View (Hansatech), simulando condiciones extremas de concentración de oxígeno.

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

8.3. Programa de la RT-PCR y tratamiento matemático de los datos utilizado para determinar el cambio en la expresión génica

La variación de la expresión génica se determinó mediante el programa “QuantStudio Real-Time PCR Software” de la casa comercial ThermoFisher, que recoge un valor de CT determinado, lo que permite, mediante una serie de cálculos matemáticos (35), determinar el cambio que en la expresión de los genes de estudio. Los cálculos realizados fueron los siguientes:

- Se calculó la media de las réplicas técnicas
- Se calculó $\Delta CT = (CT \text{ gen de interés} - CT \text{ gen housekeeping})$
- Se calculó $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ muestra tratada} - \Delta CT \text{ muestra control}$
- Se obtuvo la variación de la expresión del gen o Foldchange, que se calcula como $2^{-\Delta\Delta CT}$ (en caso de que el valor obtenido sea menor que uno, se calcula el inverso y se cambia de signo).

Los genes de *Anabaena* PCC7120 para los que se estudiaron cambios en la expresión fueron *linB*, *linE*, *cat* y *prxA* empleando el gen *rnpB* como “housekeeping”. El programa mediante el cual se llevó a cabo la Real Time PCR está representado en la Tabla S-1.

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

Tabla S-1. Programa utilizado para la realización de la RT-PCR

8.4. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de Real Time PCR

Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Secuencia amplificada
rnpB for	AGCGGAAGTGGTAAAAGACCAA	Gen <i>rnpB</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
rnpB rev	GAGAGGTAAGTGGCTCGGTAAACC	
linB for	CGATCGCACTCTCAAAGCTATAATC	Gen <i>all0193</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
linB rev	TCACATAGTAGCGCCAGATATGC	
linE for	ACTTCCGCATCTCTGCAAAAA	Gen <i>all0352</i> de <i>Anabaena</i> PCC7120
linE rev	CAGCCGTCTATTTGGCAACA	
prxA for	GATGTGGCCTATCCGTTGGT	Peroxirredoxina A de <i>Anabaena</i> PCC7120
prxA rev	CGCATCAGGATCAAGAACATTG	
cat for	GAAATTGCAATATTTTCAGACCACCC	Mn-catalasa (<i>alr0998</i>) de <i>Anabaena</i> PCC7120
cat rev	GGGCAATCATTGTTGCCAACATC	

Tabla S-2. Cebadores utilizados para llevar a cabo la RT-PCR, obtenidos con el programa Prime Express 3.3 (AppliedBioSystems)

8.5. Cuantificación de la concentración de isómeros del HCH en presencia de *Anabaena* PCC7120

Muestra	Concentración de α -HCH ($\mu\text{g/mL}$)			
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 6
Control	740.17 \pm 28.45	533.04 \pm 47.53	458.17 \pm 40.61	364.71 \pm 31.00
<i>Anabaena</i> PCC7120	740.17 \pm 28.45	625.14 \pm 16.15	47.87 \pm 1.03	3.620 \pm 0.57

Tabla S-3. Degradación de α -HCH por *Anabaena* PCC7120

Nota. Los valores corresponden a la media aritmética \pm SD de dos determinaciones.

Muestra	Concentración de γ -HCH ($\mu\text{g/mL}$)			
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 6
Control	3039.98 \pm 196.82	4011.395 \pm 702.08	3712.36 \pm 513.19	3866.79 \pm 662.30
<i>Anabaena</i> PCC7120	3039.98 \pm 196.82	3278.97 \pm 289.07	1501.06 \pm 308.86	9.96 \pm 4.63

Tabla S-4. Degradación de γ -HCH por *Anabaena* PCC7120

Nota. Los valores corresponden a la media aritmética \pm SD de dos determinaciones.

Muestra	Concentración de β -HCH ($\mu\text{g/mL}$)			
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 6
Control	130.39 \pm 32.49	135.81 \pm 37.77	106.79 \pm 44.63	103.74 \pm 7.98
<i>Anabaena</i> PCC7120	130.39 \pm 32.49	56.58 \pm 1.63	59.89 \pm 0.98	69.49 \pm 12.20

Tabla S-5. Degradación de β -HCH por *Anabaena* PCC7120

Nota. Los valores corresponden a la media aritmética \pm SD de dos determinaciones.

Muestra	Concentración de δ -HCH ($\mu\text{g/mL}$)			
	Día 0	Día 1	Día 3	Día 6
Control	845.27 \pm 191.58	933.30 \pm 101.27	751.93 \pm 26.91	365.07 \pm 77.34
<i>Anabaena</i> PCC7120	845.27 \pm 191.58	376.07 \pm 11.52	183.99 \pm 12.10	142.36 \pm 12.89

Tabla S-6. Degradación de δ -HCH por *Anabaena* PCC7120

Nota. Los valores corresponden a la media aritmética \pm SD de dos determinaciones.

	Concentración de isómeros del HCH ($\mu\text{g/mL}$)							
	Control				<i>Anabaena</i> PCC7120			
	α -HCH	β -HCH	γ -HCH	δ -HCH	α -HCH	β -HCH	γ -HCH	δ -HCH
Día 0	9.7 \pm 4.4	130.4 \pm 32.5	39.6 \pm 21.3	13.7 \pm 5.1	9.7 \pm 4.4	130.4 \pm 32.5	39.6 \pm 21.3	13.7 \pm 5.1
Día 1	3.3 \pm 1.2	135.8 \pm 37.8	20.7 \pm 3.9	5.1 \pm 1.1	-	56.6 \pm 1.6	-	-
Día 3	1.4 \pm 0.2	106.8 \pm 44.6	15.3 \pm 7.0	1.0 \pm 0.1	-	59.9 \pm 1.0	-	-
Día 6	0.8 \pm 0.0	103.7 \pm 8.0	15.2 \pm 2.4	1.3 \pm 0.5	-	69.5 \pm 12.2	-	-

Tabla S-7. Degradación de isómeros del HCH en el producto comercial de β -HCH

Nota. Los valores corresponden a la media aritmética \pm SD de dos determinaciones.

8.6. Alineamientos de secuencias

8.6.1. Alineamiento entre *all3836* de *Anabaena* PCC7120 y *linC* de *S. paucimobilis* para determinar la existencia de homología

```

#=====
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: Nostoc_sp._PCC_7120
# 2: Sphingomonas_paucimobilis
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 271
# Identity:      82/271 (30.3%)
# Similarity:   129/271 (47.6%)
# Gaps:         23/271 ( 8.5%)
# Score: 341.5
#
#=====

Nostoc_sp._PC      1 MNGLKGNLITGASSGIGQAIIRLAQEGCNIAINYRKSPSGAEETEEM      50
|:|.||...:|..|||:|...|...|:|:.....:|...
Sphingomonas_    1 MSDLSGKTIIVTGGGSGIGRATVELLVASGANVVPVADINDEAGEAV----      46

Nostoc_sp._PC     51 ALQKACKNVEICGVKSLLVQGDVSEQEEDVEMMNTVIEEFGLDILINNA     100
|...|.|:....:|:|...:|...:|.||...||
Sphingomonas_    47 -----VATSGGKAAAYFRCDIAQEEDVKALVAQTLAAFGLDGSFNNA     88

Nostoc_sp._PC     101 GI-QTECP SHEITAEDFDRVIGVNL RGSYLCARETIKHL LTONRSGVIIN     149
.| |...|...|:..|.|:..:|:|:|...|...:..:|:|
Sphingomonas_    89 AIPQAGLPLAEVSLERFRQSM DINVGTGFLCMKYQILAMIERGTKGSIVN     138

Nostoc_sp._PC     150 ISSVHEIIPRPMYVSYSISKGMENMTKTLALEYAHRGIRVNSVAPGATI     199
.:|.....:|:..|.|:..:|:..:|:..:|...|||:|:|...
Sphingomonas_    139 TASAAGVGVPMHGEYV GAKHAVVGLTRVAAADYGKHGIRVNALVPGAVR     188

Nostoc_sp._PC     200 TP-INEAWTDDPEKKAVVESHIPMRRAGTSEEMAAVAFLASDEAAAYITG     248
|| :..|...|:..:..:|...:|...:|.|.|.|.|.|.|:|:|
Sphingomonas_    189 TPMLQRAMDNDAGLEPYLNSIHP IGRFSEPHEQAQAAVWLLSDAASFVTG     238

Nostoc_sp._PC     249 QTLFVDGGLSLYADFPWISA      269
..|.|||:..
Sphingomonas_    239 SCLAADGGFTAI-----      250

#-----
#-----

```

8.6.2. Alineamiento múltiple entre proteínas homólogas a la proteína LinC de *S. paucimobilis*

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Cylindrospermopsis_raciborskii      -----MTSVKDQVAIVTGASRGIGRAIALQLAEKGAKIVVNYA
Nostoc_sp._PCC_7120                  -----MNLKGGKNTLITGASSGIGQAIIRLAQEGCNIAINYR
Calothrix_sp._336/3                    -----MDRVKDKVIVITGAALGIGRATSLLLAKEGAKVAVTDI
Cyanothecae_sp._CCY0110               -----MMNESEDDRGKVFVITGAASGIGRATLAFAREGVNVVADI
Sphingomonas_paucimobilis            -----MSDLSGKTIIVTGGGSGIGRATVELLVASGANVPVADI
Nodularia_spumigena_CCY9414          MYPLQGMKAMKNDLFDLTGKVAIITGAARGIGKATIAQGLADAGKVVVADI
Microcystis_aeruginosa_NIES_25       -----MTNHLFDLTGKVAIITGAARGIGRVL AQGLAQAGAKVVIGDI
Fischerella_sp._JSC-11               -----MQQNLFDLSGKVAIITGSGRGLGKVMVAVGLDFGKVIIVGDR
Tolypothrix_sp._PCC_7601             -----MELANKIALITGASSGIGRETAKLFALEGAKVALADI
Synechococcus_sp._CC9311             -----MISIDLSGGLVLTGGAGSIGRAIATQAAQAGASIAVCDT
                                     . : * . . . * : . * . : .

Cylindrospermopsis_raciborskii      SS-----STAAEKVVSEIIALGGEAIALQADV SQAGQVEDMVNKTLE
Nostoc_sp._PCC_7120                  KSPSGAEETEEMALQKACKNVEICGVKSLLVQGDV SQEEDVEMVNTVIE
Calothrix_sp._336/3                    RHD-----EGKALVEIEIQNGEAVYWHLDV SQEPQVQVVEGVAK
Cyanothecae_sp._CCY0110               SE-----QGNQETTRLEEMGGQAI AVKCDVTQTESVKSALDKTIE
Sphingomonas_paucimobilis            ND-----EAG---EAVVATSGGKAAYFRCDIAQEEDVKALVAQT LA
Nodularia_spumigena_CCY9414          KQ-----AEAATVEIIQDAGGEAVAFHTDVT KRGDCCQLIQQTVN
Microcystis_aeruginosa_NIES_25       NQ-----VGAEQTAQLIQEAGGEAIAIETDVRQRQACQLINQAV A
Fischerella_sp._JSC-11               NF-----EEAKQTAQTIK DAGGVASATFVDISESDSCNDLIQFAV N
Tolypothrix_sp._PCC_7601             DS-----VGGQTLIDEIKLFGGTALFHPVDV SVSEVQNWIAGVVH
Synechococcus_sp._CC9311             NV-----EEVEAVAAQIRTN GAVAKSFDMDVTDPMVMKQVIDSAV K
                                     : . : * : .

Cylindrospermopsis_raciborskii      TFNRIDLLVNNAGIT-RDTLLLRMKLEDWQAVIDNLTGVFLCTKAVSKI
Nostoc_sp._PCC_7120                  EFGSLDILINNAGIQ-TECPSHEITAEDFDRVIGVNL RGSYLCARETIKH
Calothrix_sp._336/3                    KWGRVDVLLVNNAGISGVNKP THKITQE EWNVAVMAINVNVGFLCTKHVIPL
Cyanothecae_sp._CCY0110               SFGRLDFAFNNAAGVEQKKAATAEIEEQEWDRI VDTNLRGVFLCMKYE IPL
Sphingomonas_paucimobilis            AFGGLDGSFNNAAIPOAGLP LAEVSLEFRQSM DINVGTFLCMKYQILA
Nodularia_spumigena_CCY9414          YYNRLDILVCNAGIDILKPLIALEE-DEWDAI INVDLKG YFNCVQLAAKQ
Microcystis_aeruginosa_NIES_25       HYGQLDIMVCNAGVEIKNTDELEE-FEWDQVINVD LKGYFNCACLATKQ
Fischerella_sp._JSC-11               EFGQVNILVNNAGIDIKPAEAI LE-SEWDEILNVNLKGHFHCSQFAAIQ
Tolypothrix_sp._PCC_7601             EWGGIDILVANAAMVIGTVEQATE-LDWDRLVAVNVKGYAFCAKYVTPQ
Synechococcus_sp._CC9311             ELGPLRGLVTAAGVLR TGPLSSQSH-EDWKRVM AVNVDTGLHAVQAAPH
                                     . : . * . : . : : * . :

Cylindrospermopsis_raciborskii      MLKQ-RSGRIINISSVAGQMGNPGQ-ANYSAAKAGVIGFTKTVAKELASR
Nostoc_sp._PCC_7120                  LLTQNRSGV IINISSVHEIIPRPMY-VSYSISKGGMENMKT LALEY AHR
Calothrix_sp._336/3                    MLSG-GGGSIIINISAVYGLV GSPSV-PPYHASKGAVRLMSKTD AVL YAAN
Cyanothecae_sp._CCY0110               LLKQG-GGAIVNTSSGAGVIGIKSG-AAYTAAKHGLIGLTKAAALDYASQ
Sphingomonas_paucimobilis            MIERGTKGSIVNTASAAGVGVPMH-GEYVGAKH AVVGLTRVAAADYKGH
Nodularia_spumigena_CCY9414          MIAQGTGGSIIIMNSSIAGVIGIADS-AAYTAAKGGVNLV KSLAVEWANY
Microcystis_aeruginosa_NIES_25       MIKQGTAGSIIIMNSSICAFVAVPKSSGAYSAAKGGVNLV KSLAVELASH
Fischerella_sp._JSC-11               MMKQNTGGAIINISSIASVVGIPGL-VAYSAAKGGINQLTRVMAVEWASK
Tolypothrix_sp._PCC_7601             MRQRG-GGAIIVNLASISSFVAVPAF-APYNTSKGAILQLTRSLAYDLAPD
Synechococcus_sp._CC9311             L--ESTHGSIVTLGVS SAFIGSADG-GAYTTSKGA VLSLYAAAGELAPR
                                     : * * : . : : * * : . :

Cylindrospermopsis_raciborskii      GITVNAVAPG-FIQDTMTSEIKAEG-----ILQYIPLGRFGKPEEI
Nostoc_sp._PCC_7120                  GIRVNSVAPG-ATITPINEAWTDDPEK---KAVVESHIPMR RAGTSEEM
Calothrix_sp._336/3                    NIRVNSVHPG-FIWTPMIEDAFKKQGLPQQGRKYLD SLHPLGHMGPEDEV
Cyanothecae_sp._CCY0110               NIRINAVAPG-YINTSMDFRTGGTAEG---RHKVVSQEP IGRVGPQPEEI
Sphingomonas_paucimobilis            GIRVNALVPG-AVRTPMLQRAMNDAGL---EPYLN SIHPIGRFSEPEHQ
Nodularia_spumigena_CCY9414          NIRVNAFAPG--YINNIMEGTEQFRLPSEQDQEH LKRVIPMKRRGPEQEL
Microcystis_aeruginosa_NIES_25       KIRVNAFAPG--YMNMMMEGTEGLRSTS-DEMDEL YTRIPMKRTGDLEEL
Fischerella_sp._JSC-11               NIRVNAIAPG--YFENIMLGAN-VEHEKLEKQKQIITFTPMARRGKPEEL
Tolypothrix_sp._PCC_7601             NIRVNCVCPGPIYTSAVQVATSLGLSDEDLVKQFAPL TLLKRMGQPQEV
Synechococcus_sp._CC9311             GIRVNNVAPG-WVDGGFTHQALAA SDNPEHLRKRASSLHPLGRMASPRDV
                                     * : * . * * . : : . . :

Cylindrospermopsis_raciborskii      AGMVSFLATDPAAYITGQVFNVDGGMVI-----
Nostoc_sp._PCC_7120                  AAAVAF LASD-EAAYITGQTLFVDGGLSLYADFREPWSA
Calothrix_sp._336/3                    AYGILY LASD-ESKFVTGTELVIDGGYTAR-----
Cyanothecae_sp._CCY0110               ANAVVWLCSD-ASSFVVGHALVVDGGQTV-----
Sphingomonas_paucimobilis            AQAAVWLLSD-AASFVTGSLAADGGFTAI-----
Nodularia_spumigena_CCY9414          VGPVIFLASE-AAAYVTG TILMVDGGYS AI-----
Microcystis_aeruginosa_NIES_25       IGPVVF LASE-ASSYVTGAILMVDGGYTAI-----
Fischerella_sp._JSC-11               IGPLVFLASD-ASSYITGAILFVDGGYTAA-----
Tolypothrix_sp._PCC_7601             ANAILFLASD-KASFITGTPLMVDGGYTAY-----
Synechococcus_sp._CC9311             ANAVIWL LSN-QAAFITGSMLLV DGGFMIQHNS-----
                                     : * : : : * : * *

```

8.7. Árbol filogenético de proteínas homólogas a la proteína LinC de *S. paucimobilis*

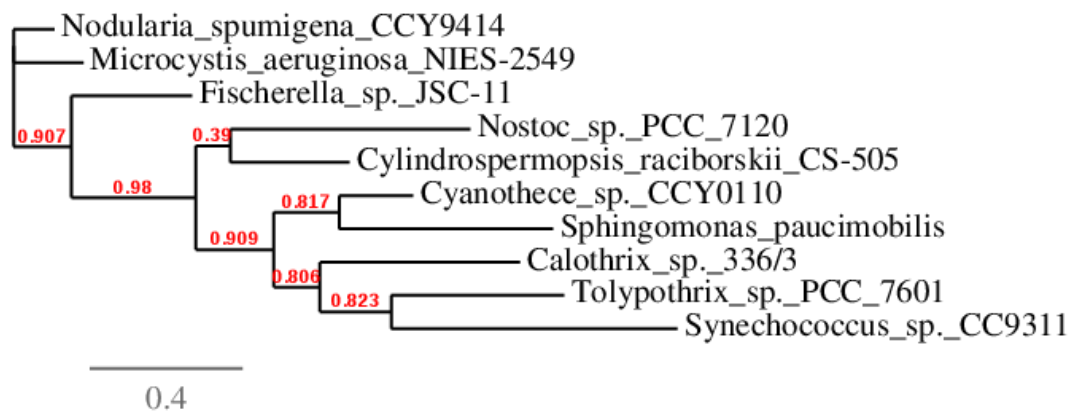


Figura S-2. Árbol filogenético de proteínas homólogas a LinC de *S. paucimobilis*