



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE LINDANO

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF LINDANE-DEGRADING BACTERIA

**GRUPO DE BIOGEOQUÍMICA AMBIENTAL Y MATERIAS PRIMAS
MINERALES (BIOGEOAMB), UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
JULIO, 2024**



AUTORA: SILVIA TOCINO ANTONIO

**MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA DEL MEDIO AMBIENTE Y LA SALUD
UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

CURSO ACADÉMICO 2023/2024



CERTIFICACIÓN DE TUTORES

Tutora: Ana Isabel Peláez Andrés. Profesora titular, Área de Microbiología, Dpto. Biología Funcional, Universidad de Oviedo

Cotutor: Alexander Prosenkov. Investigador, Dpto. Explotación y Prospección de Minas INDUROT, Universidad de Oviedo

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “*Caracterización bioquímica y molecular de bacterias degradadoras de lindano*” ha sido realizado por la Graduada en el Máster en Biotecnología del Medio Ambiente y la Salud Dña. Silvia Tocino Antonio en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Grupo de Biogeoquímica Ambiental y Materias Primas Minerales (BIOGEOAMB) de la Universidad de Oviedo bajo su dirección, constituyendo el Trabajo Fin de Máster de la interesada, cuya presentación se autoriza.

Oviedo, a 4 de julio de 2024

Fdo. Ana Isabel Peláez Andrés

Fdo. Alexander Prosenkov

RESUMEN

El γ -hexaclorociclohexano (γ -HCH), también conocido como lindano, es un hidrocarburo organoclorado sintético con actividad insecticida, ampliamente utilizado en todo el mundo hasta la década de los noventa. Debido a sus aplicaciones y propiedades fisicoquímicas, es un contaminante altamente persistente en el medio ambiente, capaz de bioacumularse en la cadena alimentaria, desencadenando efectos significativamente negativos en la salud humana, animal y ambiental.

En este trabajo se determinan los mecanismos de degradación de lindano de las bacterias *Cupriavidus* cepa I12, *Mesorhizobium* cepa I16 y *Sphingobium* cepa I19, aisladas de un emplazamiento contaminado con lindano y para las que previamente se había descrito actividad degradadora. Con este fin, se realizó un análisis bioinformático de los tres genomas en busca de genes implicados en las rutas de degradación; y se analizó semicuantitativamente la producción de biosurfactantes capaces de emulsionar el lindano en cultivo líquido.

Los resultados obtenidos confirman la existencia de genes implicados en la degradación de γ -hexaclorociclohexano, clorociclohexano y clorobenceno en I12, I16 e I19, logrando completar la ruta metabólica en consorcio. Asimismo, se observó la producción de biosurfactantes en los tres casos, obteniendo una mayor capacidad emulsionante en presencia de lindano como única fuente de carbono.

Todo ello constituye el punto de partida en el diseño de una aproximación biotecnológica que utilice conjuntamente la capacidad degradadora y emulsionante de las cepas I12, I16 e I19 para lograr una rápida y efectiva recuperación de emplazamientos contaminados con lindano.

Palabras clave: γ -hexaclorociclohexano, lindano, degradación, análisis bioinformático, biosurfactantes, ruta metabólica, aproximación biotecnológica.

ABSTRACT

γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH), also known as lindane, is a synthetic organochlorinated hydrocarbon with insecticidal activity, widely used worldwide until the 1990s. Due to its applications and physicochemical properties, it is a highly persistent pollutant in the environment, capable of bioaccumulating in the food chain, triggering significant negative effects on human, animal and environmental health.

In this work, the lindane-degradation mechanisms of *Cupriavidus* strain I12, *Mesorhizobium* strain I16 and *Sphingobium* strain I19 bacteria, isolated from a lindane-contaminated site and for which degradation activity had previously described, are determined. To this end, a bioinformatic analysis of the three genomes was carried out, searching genes involved in the degradation pathways; and the production of biosurfactants capable of emulsifying lindane in liquid culture was semi-quantitatively analysed.

The obtained results confirm the existence of genes involved in the degradation of γ -hexachlorocyclohexane, chlorocyclohexane and chlorobenzene in I12, I16 and I19, completing the metabolic pathway in consortium. Biosurfactant production was also observed in all three cases, obtaining a higher emulsifying capacity in the presence of lindane as the sole carbon source.

All this constitutes the starting point for the design of a biotechnological approach that jointly uses the degrading and emulsifying capacities of strains I12, I16 and I19 to achieve a rapid and effective remediation of lindane-contaminated sites.

Keywords: γ -hexachlorocyclohexane, lindane, degradation, bioinformatic analysis, biosurfactants, metabolic pathway, biotechnological approach.

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. Lindano (γ -hexaclorociclohexano): conceptos generales.....	1
2. Toxicidad humana, animal y ambiental.....	2
3. Problemática y contaminación actual por lindano.....	3
4. Métodos de remediación.....	5
4.1.Degradación microbiana de lindano	6
4.1.1. Rutas de degradación bacteriana de hexaclorociclohexano	7
4.1.2. Optimización de la biodegradación de lindano	10
OBJETIVOS	12
MATERIALES Y METODOLOGÍA	13
1. Descripción del emplazamiento	13
2. Cepas	14
3. Extracción del ADN bacteriano y secuenciación	15
4. Procesamiento de las secuencias y anotación genómica	15
5. Determinación de la producción de biosurfactantes activos frente al lindano	17
RESULTADOS	19
1. Identificación funcional de genes implicados en la ruta de degradación de clorociclohexano	19
2. Análisis de la producción de biosurfactantes en respuesta al lindano.....	26
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	32
REFERENCIAS	33
ANEXOS	37

INTRODUCCIÓN

1. Lindano (γ -hexaclorociclohexano): conceptos generales

El **hexaclorociclohexano** (HCH), también conocido como hexaclorobenceno (HCB), es un hidrocarburo organoclorado sintético producido por primera vez por Michael Faraday en 1825 a través de la cloración fotoquímica del benceno (González De Figueras, 2020; Usmani et al., 2021). Su estructura molecular consiste en un anillo de seis carbonos, cada uno de los cuales unido también a una molécula de cloro y una de hidrógeno ($C_6H_6Cl_6$) (Lal et al., 2010).

De la reacción de formación del hexaclorociclohexano, se obtiene una mezcla conocida como “HCH técnico” o t-HCH, compuesta por ocho isómeros que difieren en la orientación de los átomos de cloro en la molécula: α (+/-), β -, γ -, δ -, ϵ -, η - y θ -HCH (Fig.1). De estos, los isómeros α -, β -, γ -, δ - y ϵ -, constituyen los principales componentes, con proporciones de 55-70%, 5-14%, 11-18%, 6-10% y 3-5%, respectivamente; mientras que los isómeros restantes se producen en cantidades traza (González De Figueras, 2020; Vega et al., 2016; Vijgen et al., 2011).

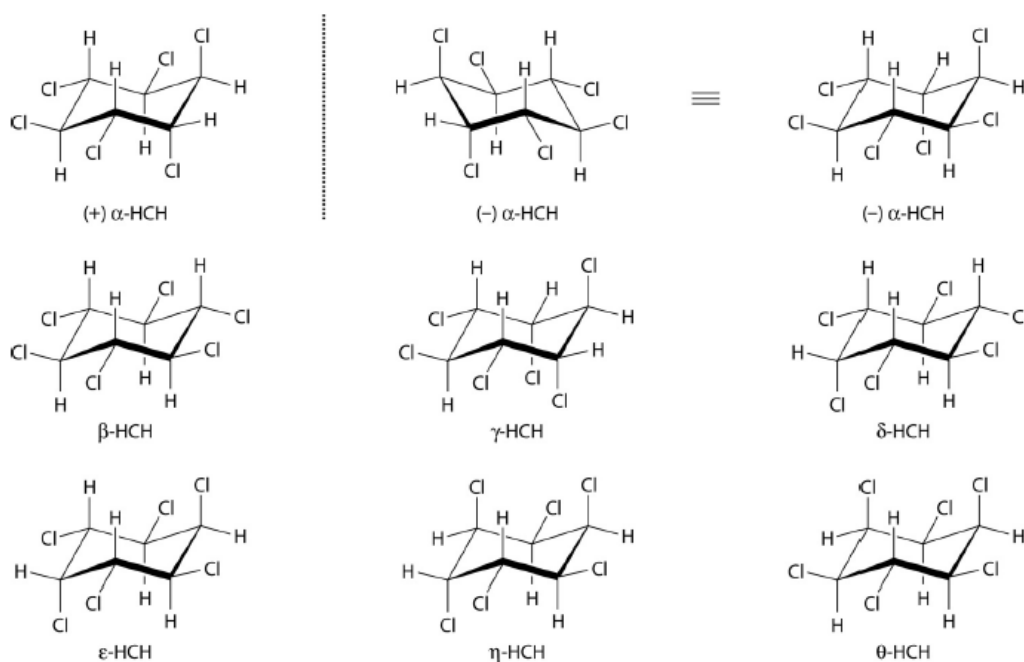


Figura 1. Disposición espacial de los isómeros del t-HCH: α - (enantiómeros +/-), β -, γ -, δ -, ϵ -, η - y θ -HCH, según la orientación – axial o ecuatorial – de los átomos de cloro alrededor del anillo. **Fuente:** Lal et al., 2010.

De todos los isómeros, sólo el γ -HCH presenta propiedades insecticidas, y ha sido producido y comercializado bajo el nombre de **lindano** (γ -HCH al 99% de pureza) desde

la Segunda Guerra Mundial hasta la década de los noventa con fines agrícolas y de salud pública (Nagata et al., 2007; Vijgen et al., 2011; Zhang et al., 2020). Entre sus usos destaca su aplicación en tratamientos de suelos y semillas, programas contra plagas de insectos, y el tratamiento de ectoparásitos animales y humanos como piojos y sarna, así como su uso en la lucha contra la malaria en todo el mundo (Boudh et al., 2017).

En condiciones normales, el lindano es un sólido cristalino de gran densidad (PM: 290,83 g/mol) con un característico olor a mohó. Presenta una baja solubilidad en agua, pero una alta solubilidad en grasas y solventes orgánicos. Es un compuesto altamente hidrofóbico y volátil, cuya vida media en suelo y agua es de 708 y 2292 días, respectivamente. Todas estas características hacen del lindano un contaminante persistente y ubicuo en el medio ambiente, facilitando su bioacumulación en la cadena alimentaria y desencadenando efectos significativos sobre la salud humana, animal y ambiental (González De Figueras, 2020; Madaj et al., 2018; Zhang et al., 2020).

2. Toxicidad humana, animal y ambiental

El lindano es un insecticida de amplio espectro que basa su actividad en la hiperexcitación del sistema nervioso a través de la interacción con el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA), manifestándose en parálisis, convulsiones y muerte (Kumar & Pannu, 2018; Zhang et al., 2020). Además de neurotoxicidad, el lindano presenta efectos carcinogénicos, mutagénicos, genotóxicos, teratogénicos, inmunosupresivos y de disrupción endocrina (Loomis et al., 2015; Vega et al., 2016; Zhang et al., 2020). De hecho, desde junio de 2015, está clasificado como carcinógeno de Grupo 1 por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, del inglés *International Agency for Research on Cancer*) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Loomis et al., 2015).

En humanos, la intoxicación aguda por lindano se manifiesta mediante disfunción respiratoria, temblores, náuseas, pérdida de conciencia, convulsiones y, en casos extremos, la muerte del paciente (Madaj et al., 2018; Usmani et al., 2021). La primera muerte registrada por envenenamiento agudo por lindano data de 1953 (Zhang et al., 2020). A largo plazo, los efectos por exposición prolongada al γ -HCH incluyen cánceres de mama, próstata, colon, pulmón, hígado, recto, vejiga y estómago, así como una mayor incidencia de linfoma no-Hodgkin y alteraciones hematológicas como leucopenia o trombocitopenia, entre otras (Loomis et al., 2015; Vega et al., 2016; Zhang et al., 2020).

Por otro lado, aunque en menor medida, también se han detectado efectos sistémicos como depresión de la función hepática, arritmias cardíacas, menstruación alterada y necrosis en los vasos sanguíneos del cerebro, pulmones y riñones (Nolan et al., 2012; Vega et al., 2016).

Las propiedades fisicoquímicas del lindano permiten su diseminación a grandes distancias, causando una contaminación generalizada en ambientes terrestres y acuáticos, así como su bioacumulación y biomagnificación en microorganismos, invertebrados, peces, aves, mamíferos, plantas y algas, desencadenando impactos negativos en la biodiversidad, las poblaciones microbianas y la bioactividad de los diferentes ecosistemas (Usmani et al., 2021; Vega et al., 2016; Zhang et al., 2020).

En animales, el efecto neurotóxico del γ -HCH inhibe el crecimiento de la fauna del suelo y produce, además de la muerte de insectos, cambios en el comportamiento de los animales, desde desatención del cuidado de las crías hasta una menor conciencia frente a los depredadores. Asimismo, como disruptor endocrino, tiene efectos negativos sobre la ovulación animal y produce feminización y daño hepático y/o renal (González De Figueras, 2020; Madaj et al., 2018).

Su impacto sobre las especies vegetales se manifiesta mediante problemas en la germinación y/o crecimiento, y en alteraciones de procesos fisiológicos y de desarrollo, como la fotosíntesis. Finalmente, el lindano inhibe las reacciones de oxidorreducción de los microorganismos del suelo, así como la actividad enzimática de bacterias amino- y metano-oxidantes, y afecta a la estructura, riqueza y diversidad microbianas de los ecosistemas (González De Figueras, 2020).

3. Problemática y contaminación actual por lindano

Debido a su impacto sobre los seres humanos y los ecosistemas, el lindano y el resto de isómeros del HCH han sido intervenidos en las últimas décadas por agencias regulatorias ambientales de todo el mundo (Kumar & Pannu, 2018). Desde 2006, el lindano aparece en la lista prioritaria de contaminantes de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, del inglés *United States Environmental Protection Agency*), y en 2009 los isómeros α - β - y γ -HCH se incluyeron en la lista de Contaminantes Orgánicos Persistentes (POPs, del inglés *Persistent Organic Pollutants*) de la Convención de Estocolmo (Vijgen et al., 2011). En los años setenta, Japón se

convirtió en el primer país del mundo en prohibir la utilización de lindano y, hoy en día, más de 52 países han prohibido su producción, comercialización y uso, siendo China el último en unirse a la lista en 2019 (Vijgen et al., 2011; Zhang et al., 2020). Sin embargo, a pesar de las restricciones impuestas por la mayoría de los países, los isómeros del HCH han conseguido penetrar en el medio ambiente debido a la frecuente pulverización de los cultivos agrícolas, derrames accidentales, residuos de uso doméstico, y el vertido de residuos y efluentes industriales; convirtiéndose en compuestos persistentes y ampliamente distribuidos en los ecosistemas (Kumari et al., 2002; Zhang et al., 2020).

En la purificación del lindano, el resto de isómeros se descarta como desechos de producción, generando entre 8 y 12 toneladas por cada tonelada de γ -HCH. El almacenamiento de estos subproductos en depósitos cerrados, vertederos al aire libre e, incluso, enterrados, se ha convertido en la principal fuente de contaminación (Lal et al., 2010; Vijgen et al., 2011; Zhang et al., 2020). Una vez en el medio ambiente, los isómeros experimentan procesos de adsorción en partículas, lixiviación, dilución y volatilización, permitiendo su transporte a largas distancias y la contaminación de áreas tan remotas como el Ártico, la Antártida o el Océano Pacífico (Lal et al., 2010; Madaj et al., 2018). De hecho, además de su detección en suelo, sedimentos, agua, plantas, alimentos y tejidos animales de todo el mundo, se han encontrado restos de lindano en muestras humanas de cerebro, leche y sangre maternas e, incluso, en muestras de placenta y cordón umbilical, demostrando que es un compuesto altamente recalcitrante y de gran alcance (Boudh et al., 2017; Nolan et al., 2012; Usmani et al., 2021).

En términos numéricos, entre las décadas de 1950 y 2000, la Asociación Internacional de HCH y Pesticidas (IHPA, del inglés *International HCH & Pesticides Association*) estima una producción global de lindano de 600.000 toneladas, de las cuales 450.000 t habrían sido destinadas a fines agrícolas y 150.000 t a aplicaciones forestales, veterinarias o de salud pública. Además, dicha producción habría supuesto la generación de entre 4 y 7 millones de toneladas de subproductos, principalmente α - (80%) y β -HCH (Vijgen et al., 2011). A nivel europeo, tan solo 10 países son los responsables del 96% de la producción y uso de lindano en el continente: Alemania, la antigua Checoslovaquia, España, Francia, Grecia, Hungría, Italia, Rusia, Ucrania y la antigua Yugoslavia (*Fig.2*) (Vega et al., 2016).



Figura 2. Principales países productores y consumidores de lindano en la Unión Europea. Las estrellas (★) identifican los diferentes puntos de contaminación. El signo de interrogación (?) hace referencia a países productores de los que no se conocen emplazamientos contaminados. **Fuente:** Vega et al. 2016.

En España, cuatro compañías principales se encargaron de la producción de lindano entre los años 1947 y 1988, generando alrededor de 200.000 toneladas de subproductos que han contaminado emplazamientos en distintos puntos del norte de la Península: Barakaldo (Bizkaia, País Vasco), Sabiñánigo (Huesca, Aragón), O Porriño (Pontevedra, Galicia), Cabria (Palencia, Castilla y León) y Navarra (Vega et al., 2016).

4. Métodos de remediación

Los métodos tradicionalmente utilizados para el tratamiento y la descontaminación de emplazamientos afectados por lindano van desde la excavación de suelos y su almacenamiento en vertederos, hasta el confinamiento de aguas subterráneas y la incineración de los residuos. Sin embargo, además de necesitar grandes cantidades de energía e infraestructuras especializadas, son caros, poco respetuosos ambientalmente y no eliminan propiamente los contaminantes. Por otro lado, los **métodos fisicoquímicos** incluyen, por ejemplo, el uso de adsorbentes, nanopartículas, electro-oxidación y decloración química. No obstante, siguen siendo aproximaciones caras, además de suponer la liberación de contaminantes químicos al medio ambiente (Vega et al., 2016).

Durante las últimas décadas han cobrado especial importancia los métodos de remediación biológicos, puesto que presentan bajo costo y necesidades de mantenimiento, además de ser fácilmente aplicables *in situ*, y ser considerados más respetuosos con el medio ambiente (Castellanos & Rache, 2013). Los métodos de **biorremediación** de lindano y otros pesticidas clorados incluyen la bioadsorción, bioacumulación y biotransformación de los contaminantes y se centran principalmente, a excepción de la fitorremediación, en el uso de microorganismos (Kumar & Pannu, 2018).

4.1. Degradación microbiana del lindano

A pesar de que el HCH y sus isómeros son relativamente nuevos, su extenso uso en suelos agrícolas ha supuesto que, en apenas 70 años, los microorganismos autóctonos hayan desarrollado mecanismos de adaptación genética. La síntesis de enzimas que oxidan, hidrolizan e hidroxilan estos compuestos posibilita su utilización como única fuente de carbono y el crecimiento de microorganismos a concentraciones subletales, facilitando su degradación o biotransformación (Castellanos & Rache, 2013).

Actualmente, se ha descrito una gran variedad de microorganismos capaces de degradar el lindano a metabolitos menos tóxicos (Kumar & Pannu, 2018). Destacan tanto bacterias gram-negativas, pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Paracoccus* y *Flavobacterium*; como bacterias gram-positivas del filo Actinomycetota (ej., bacterias de los géneros *Arthrobacter*., *Streptomyces*, *Rhodococcus*), capaces de romper moléculas complejas como los pesticidas en ambientes muy diversos (Boudh et al., 2017; Castellanos & Rache, 2013; Menéndez et al., 2016; Zhang et al., 2020). Asimismo, algunos hongos como *Phanerochaete chrysosporium*, también presentan enzimas extracelulares de clorinasas, deshalogenasas y peroxidasas capaces de degradar el lindano y otros pesticidas (Boudh et al., 2017; Zhang et al., 2020). Finalmente, ciertos microorganismos presentes en ríos y lagos son capaces de acumular y/o degradar el lindano de los ecosistemas acuáticos: algas como *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Anabaena sp.* y *Nostoc ellipsosporum*; y algunas cianobacterias de los géneros *Oscillatoria* y *Synechococcus* (Boudh et al., 2017).

4.1.1. Rutas de degradación bacteriana de hexaclorociclohexano

El hexaclorociclohexano tiene seis átomos de cloro por molécula, siendo un compuesto altamente recalcitrante (Zhang et al., 2020). Se han descrito rutas bacterianas de degradación aeróbicas y anaeróbicas. Sin embargo, la mineralización completa del HCH generalmente se consigue solo bajo condiciones aeróbicas (Nagata et al., 2007; Zhang et al., 2020).

i. Degradación anaeróbica

El proceso de degradación anaeróbica del HCH comienza con dos dicloro-eliminaciones consecutivas que dan lugar a los intermediarios 3,4,5,6-tetraclorociclohexa-1,2-dieno (TCCH) y 5,6-diclorociclohexa-1,2-dieno (DCCH). Seguidamente, éste último sufre una deshidrocloración hasta clorobenceno (CB) (Lal et al., 2010; Zhang et al., 2020). Otras rutas descritas producen pentaclorociclohexeno (PCCH) a partir de HCH, que es transformado a 1,2-diclorobenceno (1,2-DCB) y 1,3-diclorobenceno (1,3-DCB), generando como productos finales clorobenceno y benceno, que son acumulados en las células (Zhang et al., 2020) (Fig.3).

Estas rutas de degradación independientes de oxígeno se han detectado para los isómeros α -, β -, γ -, y δ -HCH en algunas bacterias anaeróbicas de los géneros *Clostridium*, *Citrobacter*, *Desulfovibrio*, *Desulfococcus*, y *Dehalobacter* (Lal et al., 2010).

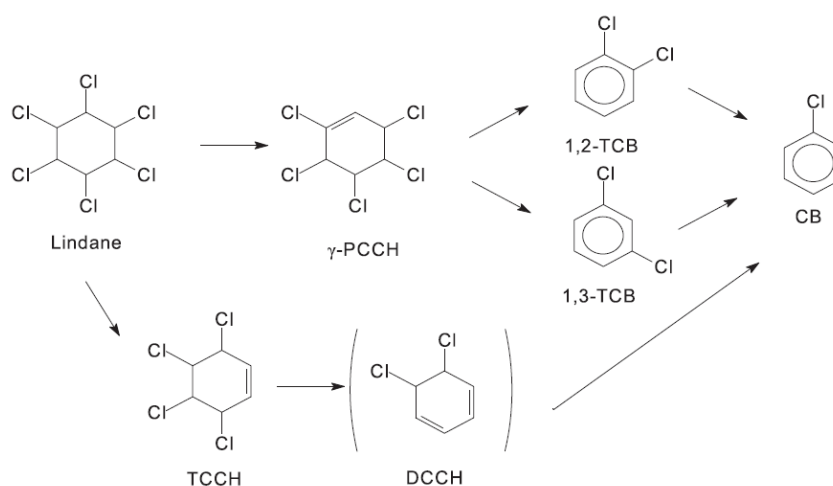


Figura 3. Rutas de degradación anaeróbicas de lindano. **Fuente:** Zhang et al. 2020.

ii. Degradación aeróbica de γ -HCH: genes *lin*

La reacción clave en la degradación de lindano es la eliminación de los átomos de cloro. En la ruta aerobia las principales reacciones incluyen deshidrogenación,

declorinación, hidroxilación, deshidroclorinación y mineralización (Zhang et al., 2020). La mayoría de las cepas degradadoras de γ -HCH en condiciones aeróbicas pertenece a la familia *Sphingomonadaceae*, siendo las primeras y mejor estudiadas *Sphingobium japonicum* UT26 (previamente nombrada como *Sphingomonas paucimobilis* UT26), *Sphingobium indicum* B90A y *Sphingobium francense* Sp+ (Lal et al., 2010).

El sistema de degradación completo consta de una ruta ascendente, una ruta descendente y un sistema transportador de tipo ABC, cuyas reacciones son catalizadas por las enzimas codificadas por los genes *lin*. Dichos genes han sido extensamente estudiados en *Sphingobium japonicum* UT26 (Japón, 1980s), una cepa que utiliza lindano como única fuente de carbono y energía bajo condiciones aeróbicas (Lal et al., 2010).

Ruta de degradación ascendente

En la vía ascendente, la molécula de γ -hexaclorociclohexano se transforma hasta 2,5-diclorohidroquinona (2,5-DCHQ) por las actividades enzimáticas deshidroclorinasa, halidohidrolasa y deshidrogenasa (Fig.4). Las enzimas encargadas de estas reacciones son codificadas por los genes *linA*, *linB*, *linC* y/o *linX*, que se expresan constitutivamente en UT26 (Nagata et al., 2007; Zhang et al., 2020).

- ***linA***: codifica la enzima **hexaclorociclohexano deshidroclorinasa**, una proteína homotetramérica de 16.5 kDa localizada en el periplasma de *Sphingomonas sp.* (Lal et al., 2010). Cataliza la conversión de γ -HCH en γ -pentaclorociclohexeno (γ -PCCH) y el paso de éste a 1,3,4,6-tetracloro-1,4-ciclohexadieno (1,4-TCDN). Además del lindano, los isómeros α - y δ -HCH también sufren esta deshidrocloración, pero no β -HCH (Nagata et al., 2007; Zhang et al., 2020).
- ***linB***: da lugar a una **haloalcano deshalogenasa** monomérica de 32 kDa localizada en el periplasma en *Sphingomonas sp.* (Lal et al., 2010). Lleva a cabo la transformación del 1,4-TCDN en 2,4,5-tricloro-2,5-ciclohexadieno-1-ol (2,4,5-DNOL) y su conversión a 2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol (2,5-DDOL) (Zhang et al., 2020). Por otro lado, LinB transforma el β -HCH en 2,3,4,5,6-pentaclorociclohexanol (PCHL), un compuesto que la bacteria es capaz de degradar por una combinación de rutas biológicas (Boudh et al., 2017).
- ***linC***: codifica una enzima **2,5-DDOL deshidrogenasa** de 28 kDa que cataliza el paso de 2,5-DDOL en 2,5-diclorohidroquinona (2,5-DCHQ). El gen *linC* está

presente en muchas bacterias del género *Sphingomonas sp.* degradadoras de HCH (Lal et al., 2010).

- **linX**: da lugar a una proteína con un 33% de identidad aminoacídica con LinC. Asimismo, presenta cierta actividad **2,5-DDOL deshidrogenasa** y está presente en la mayoría de *Sphingomonas sp.* degradadoras de HCH, además de haber sido aislada directamente de suelos contaminados (Lal et al., 2010).

Ruta de degradación descendente

La ruta descendente abarca las reacciones necesarias para la conversión de 2,5-DCHQ en succinil-CoA y acetil-CoA, compuestos que son posteriormente metabolizados en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Fig.4). Las enzimas implicadas en dicha conversión son codificadas por los genes *linD*, *linE/linEb*, *linF*, *linGH* y *linJ*. Además, los genes *linR* y *linI* codifican reguladores transcripcionales de tipo LysR e IclR, respectivamente, que modulan la expresión del operón *linDE* (LinR) y los genes *linGHJ* (LinI) en presencia de sus sustratos (Lal et al., 2010).

- **linD**: su producto es una **decolorinasa reductiva** de 38.4 kDa, que cataliza la conversión de 2,5-DCHQ en clorohidroquinona (CHQ) y el paso de ésta a hidroquinona (HQ) (KEGG [Base de datos], 2024; Nagata et al., 2007; Zhang et al., 2020).
- **linE**: la enzima resultante es una **dioxigenasa de rotura anular** de 36 kDa. LinE transforma, por un lado, la CHQ en acilcloruro y, por otro lado, cataliza la conversión de HQ en γ -hidroximucónico-semialdehído (γ -HMSA) (KEGG [Base de datos], 2024; Zhang et al., 2020). El gen *linEb* codifica una proteína con un 53% de identidad aminoacídica con LinE, que participa también en la degradación de CHQ (Lal et al., 2010).
- **linF**: codifica una **maleilacetato reductasa** de 38 kDa que convierte el maleilacetato formado a partir de acilcloruro y/o γ -HMSA en β -cetoadipato (Zhang et al., 2020).

- **linGH y linJ:** codifican las enzimas 3-oxoadipato acil-CoA transferasa y β -cetoadipil-CoA tiolasa, respectivamente, necesarias para metabolizar el β -cetoadipato en succinil-CoA y acetyl-CoA (Lal et al., 2010; Zhang et al., 2020).

Sistema transportador ABC

Los genes *linK*, *linL*, *linM* y *linN* codifican una permeasa, una ATPasa, una proteína periplásmica y una lipoproteína, respectivamente. Estos cuatro componentes constituyen un transportador putativo de tipo ABC necesario para la utilización del γ -HCH en las células. En concreto, dicho sistema estaría encargado de conferir tolerancia contra metabolitos tóxicos, como el 2,5-diclorofenol (2,5-DCP) generado como un subproducto del 2,4,5-DNOL (Lal et al., 2010; Nagata et al., 2007). Además de UT26, los genes *linKLMN* se han encontrado en otras cepas de *Sphingomonas sp.*, lo que podría relacionarse con su actividad contra el γ -HCH y otros compuestos xenobióticos (Nagata et al., 2007).

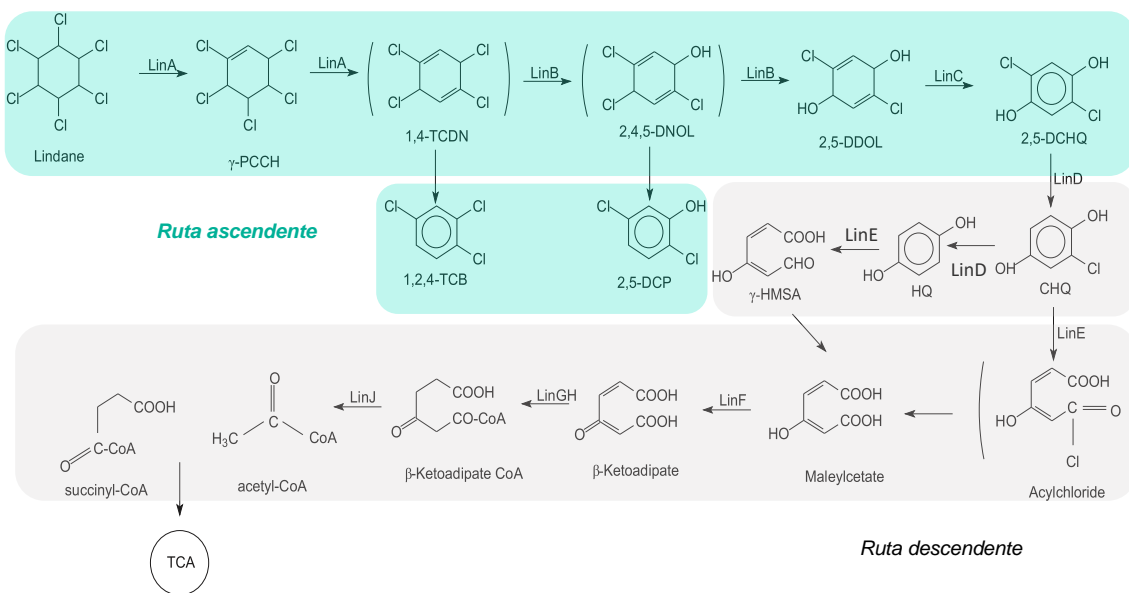


Figura 4. Ruta de degradación aeróbica de lindano en *Sphingobium japonicum* UT26. Representadas en color verde la ruta ascendente y en color gris la ruta descendente. **Fuente:** Adaptado de Zhang et al. 2020.

4.1.2. Optimización de la biodegradación de lindano

La remediación microbiana de compuestos xenobióticos como el γ -HCH depende en gran medida de las condiciones ambientales y propiedades del suelo (ej., pH, temperatura, humedad, contenido en materia orgánica y nutrientes), así como de la capacidad funcional de los microorganismos y de las propiedades del contaminante (Usmani et al., 2021).

El lindano es un compuesto de muy baja solubilidad en fase acuosa que es adsorbido por la materia orgánica del suelo, reduciendo su biodisponibilidad y protegiéndolo de la degradación (Alvarez et al., 2022). Para sortear estas limitaciones y optimizar su biodegradación, se ha propuesto el uso de cepas degradadoras en combinación con biosurfactantes o consorcios microbianos.

i. Biosurfactantes

Los biosurfactantes son moléculas anfífilas producidas principalmente por microorganismos como bacterias, levaduras y hongos. Pueden estar formados por una gran variedad de moléculas (ej., fosfolípidos, glicolípidos, ácidos grasos, lipopéptidos) y ser secretados extracelularmente o producidos en superficies de membrana (Kumar & Pannu, 2018). Debido a sus propiedades, son capaces de incrementar la desorción de determinados compuestos, mejorando así la disponibilidad de contaminantes insolubles, como el lindano (Alvarez et al., 2022).

Las ventajas de los biosurfactantes respecto a los surfactantes sintéticos más utilizados (ej., Tritón X-100, Tween80, SDS) radican en su degradabilidad natural y su baja toxicidad, ya que pueden ser utilizados como fuentes de carbono por los microorganismos del suelo. Además, han demostrado ser más eficientes a concentraciones mucho menores, por lo que se requiere una menor cantidad, abaratando el coste de los procesos (Kumar & Pannu, 2018; Sharma et al., 2009).

ii. Consorcios microbianos

La capacidad degradativa de un solo microorganismo está limitada tanto por sus propiedades genéticas como por las condiciones ambientales del emplazamiento. Sin embargo, un conjunto de microorganismos o consorcio microbiano es capaz de sortear muchas de las limitaciones metabólicas de una población única, mejorando enormemente la biotransformación de los contaminantes (Kumar & Pannu, 2018; Zhang et al., 2020).

Este tipo de comunidades existe en la propia naturaleza, donde los microorganismos se comunican unos con otros por un mecanismo denominado *quorum sensing*. De esta manera, la carga metabólica se divide entre los diferentes miembros, que viven simbióticamente en presencia de una única fuente de carbono y comparten las labores de degradación de compuestos xenobióticos, como los pesticidas (Zhang et al., 2020).

OBJETIVOS

En este trabajo se pretende determinar la capacidad y los mecanismos de degradación de lindano presentes en las cepas bacterianas I12, I16 e I19 aisladas previamente de un suelo contaminado con γ -HCH y otros isómeros en O Porriño (Pontevedra, Galicia). Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar los elementos genéticos responsables de la degradación de lindano presentes en cada una de las tres cepas, así como las potenciales rutas enzimáticas de degradación utilizadas por el consorcio bacteriano.
2. Comprobar la capacidad de las cepas para producir sustancias bioemulsionantes que potencien la degradación de lindano.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

1. Descripción del emplazamiento

El emplazamiento contaminado se sitúa en el área industrial de Torneiros, perteneciente al municipio gallego de O Porriño (Pontevedra), donde actualmente se asientan un polígono de viviendas y otras infraestructuras. En esta zona, la compañía farmacéutica Zeltia produjo entre 1947 y 1964 lindano y otros pesticidas, llegando a generar más de 1.000 toneladas de residuos de producción (Vega et al., 2016). Los residuos del vertedero se emplearon durante años como insecticidas, material de construcción, reparación de carreteras y edificación, favoreciendo la contaminación de los emplazamientos. En 1999, el área contaminada abarcaba 1 km² y los niveles de contaminación de suelo, agua y pozos de agua potable de la zona alcanzaron los 1.000 mg/kg, (Varela-Castejón & Martínez Lozano, 2008; Vega et al., 2016).

Los suelos de O Porriño fueron incluidos en el Plan para Suelos Contaminados y el Programa de Operación de la Xunta de Galicia (Vega et al., 2016). Para su estudio y confinamiento, la Consellería de Medio Ambiente dividió el área contaminada en cuatro zonas diferentes (PV-1, PV-2, PV-3 y PV-4) y dos emplazamientos industriales (*Fig. 5*). Los depósitos confirmados de γ -HCH y otros isómeros se localizan en las zonas PV-1, PV-4 y los dos emplazamientos (Varela-Castejón & Martínez Lozano, 2008). En el Emplazamiento n°1, donde se ubicaban la fábrica de Zeltia y otras farmacéuticas, el terreno afectado abarcaba aproximadamente una superficie de 30.000 m² y un volumen de suelo de 150.000 m³ (Varela-Castejón et al., 2008).

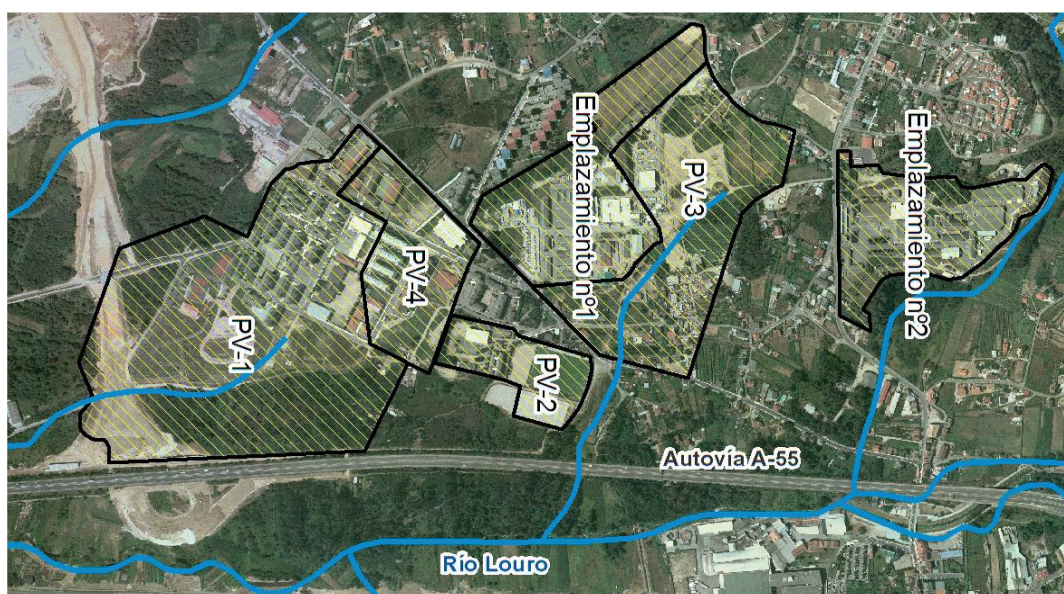


Figura 5. División del área contaminada en el polígono industrial de Torneiros. PV-1: Polígono de Viviendas de Torneiros y Circuito de Cicloturismo. PV-2: Campo de fútbol Club Porriño. PV-3: Zona norte y este del Emplazamiento nº 1. PV-4: Parroquia de San Rosendo y Edificio AIMEN Centro Tecnológico Armando Priegue. Emplazamiento nº 1: industrias Zelnova S.A., Cooper Zeltia (CZ) Veterinaria S.A. y Glaxo Wellcome Biofarma S.A. Emplazamiento nº 2: anteriormente ocupado por las industrias Zéneca Agro y Zéneca Farma. **Fuente:** Varela-Castejón et al. 2008.

2. Cepas

Las cepas bacterianas I12, I16 e I19 habían sido aisladas previamente por miembros del equipo de Microbiología Ambiental del grupo BIOGEOAMB a partir de un emplazamiento contaminado con lindano procedente del complejo industrial de Torneiros. El suelo se sometió a un cultivo de enriquecimiento en medio mineral BH con lindano como única fuente de carbono. Posteriormente, las bacterias fueron cultivadas en placas de Petri con medio de cultivo TSA 1/10 y se procedió a su identificación mediante la amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S (ADNr 16S) (García Monte, 2022). Tras la alineación de las secuencias obtenidas con la base de datos Silva 138, se confirmó que las tres cepas pertenecen al filo Proteobacteria: I12 muestra un 99.43% de identidad con el género *Cupriavidus*; I16 es un 97.34% idéntica al género *Mesorhizobium*; e I19 pertenece al género *Sphingobium* con un 99.22% de identidad (Tabla 1). Los ensayos de degradación de lindano mostraron porcentajes de eliminación del 40%, 50% y 98% para I12, I16 e I19, respectivamente. Finalmente, las tres cepas son productoras, en mayor o menor medida, de bioemulsionantes activos contra el xileno (García Monte, 2022).

El mantenimiento de las cepas en laboratorio se realizó mediante resiembras periódicas en placas con medio TSA 1:10 (Tryptocasein Soy Agar: 1,50 g/L de triptona; 0,5 g/L de digestión papaica de la harina de soja; 0,5 g/L de NaCl y 15,0 g/L de agar bacteriológico en 1 L de agua destilada a pH 7,3) (Labkem, España). Las placas se mantuvieron a 30 °C en un incubador Memmert INE 200-800 (Mettler GmbH, Alemania) durante aproximadamente 1 semana hasta la observación de las colonias bacterianas.

Tabla 1. Identificación taxonómica de las cepas I12, I16 e I19. **Fuente:** Elaborado a partir de los resultados obtenidos por García Monte, 2022.

CEPA	IDENTIDAD	FILO	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO
I12	99,43%	Proteobacteria	γ-proteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Cupriavidus</i>
I16	97,34%	Proteobacteria	α-proteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Mesorhizobium</i>
I19	99,22%	Proteobacteria	α-proteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingobium</i>

3. Extracción del ADN bacteriano y secuenciación

La extracción del ADN genómico de las cepas I12, I16 e I19 se llevó a cabo utilizando el kit NZY Microbial gDNA Isolation Kit (NZYTech, Portugal), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Los productos de extracción se cuantificaron por fluorescencia mediante el kit comercial QubitTM dsDNA HS Assay Kit (InvitrogenTM, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) y el fluorómetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante. Tras confirmar la disponibilidad de suficiente ADN extraído (> 10 µg/µL), los tres productos fueron enviados a los servicios de secuenciación (Novogene (UK) Company Limited, Reino Unido). La secuenciación genómica se realizó a través de la tecnología Illumina NovaSeq en lecturas de 2x150 nucleótidos.

4. Procesamiento de las secuencias y anotación genómica

Fastp

El procesamiento inicial de las secuencias se llevó a cabo mediante el programa informático **fastp**. El software corta los adaptadores y elimina el extremo poliG terminal añadido por la secuenciación de Illumina NextSeq/NovaSeq. Asimismo, filtra las lecturas deficientes por considerarlas de baja calidad, demasiado cortas o con un gran número de nucleótidos indeterminados (Chen, 2023). La ejecución del programa se realizó utilizando los comandos `--merge`, que combina cada par de lecturas complementarias que se solapan; `-y`, que elimina las colas poliA y poliG añadidas durante la secuenciación; y el resto de las opciones por defecto (véase *Anexo I.a*).

Como resultado se obtuvieron cinco archivos diferentes en formato fastq (.fq) para cada una de las tres cepas: (1) lecturas directas y reversas emparejadas (2) lecturas directas sin pareja (3) lecturas reversas sin pareja (4) lecturas directas sin emparejar porque sus complementarias no cumplen los controles de calidad y (5) lecturas reversas sin emparejar porque sus complementarias no cumplen los controles de calidad. Los ficheros con lecturas directas y reversas sin emparejar se combinaron manualmente en un único archivo para su procesamiento posterior.

SPAdes y QUAST

El ensamblaje de las lecturas genómicas en *contigs* se llevó a cabo mediante el ensamblador de datos de segunda generación **SPAdes** (Prjibelski et al., 2020). Los archivos de entrada incluyeron tanto las lecturas emparejadas como sin emparejar, utilizando el comando `--careful` de corrección de errores y el resto de las opciones por defecto (véase *Anexo I.b*).

La aplicación informática QUAST genera un conjunto de métricas de calidad que permiten evaluar el ensamblaje final de los genomas (Gurevich et al., 2013).

Bandage

La estructura aproximada del genoma de cada una de las tres cepas se visualizó mediante el programa informático **Bandage**. La aplicación utiliza los conjuntos de *contigs* ensamblados y los resultados generados por SPAdes para representar las posibles conexiones entre los *contigs* de forma gráfica, permitiendo obtener información sobre la geometría del cromosoma (Wick et al., 2015).

Anotación genómica: Bakta, Proksee y BLASTp

La identificación estructural y funcional de los diferentes genes y regiones codificantes – también conocida como anotación genómica – se llevó a cabo utilizando el software **Bakta** como una gran base de datos que incluye todas las secuencias de proteínas UniRef de UniProt (Schwengers et al., 2021). Se utilizaron las opciones `--min-contig-length` para excluir los *contigs* de longitud menor a 200 nucleótidos, `--gram[+,-,?]` para especificar el tipo de bacteria para las predicciones del péptido señal, `--genus` para especificar el género de la cepa, y el resto de las opciones por defecto. Adicionalmente, se utilizó el comando `--keep-contig-headers` para conservar los nombres originales de los *contigs* y facilitar el procesamiento posterior (véase *Anexo I.c*).

Como resultado, se obtuvo para cada cepa información detallada de los genes presentes en cada una de las secuencias genómicas: localización en el *contig*, tipo de material genético (ej., región codificante, ARNt, etc.), posiciones de comienzo y fin, nombre del gen, nombre de la proteína codificada y su código de referencia en bases de datos. Se empleó la aplicación informática **Proksee** para la visualización y exploración del genoma en busca de los genes de interés (Grant et al., 2023). La localización y

cercanía de dichos genes dentro de los *contigs* se representó mediante el software GenomeTools (Gremme et al., 2013).

En aquellos casos en los que las proteínas identificadas por Bakta no se relacionaron directamente con genes *lin* o similares se utilizó la herramienta **BLAST** (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*) perteneciente al NCBI (del inglés, *National Center for Biotechnology Information*). La opción *blastp* permite comparar las secuencias proteicas con otras secuencias biológicas en busca de similitudes que pudieran relacionarlas, en este caso, con proteínas implicadas en rutas de degradación de compuestos organoclorados (Altschul et al., 1990, 1997).

5. Determinación de la producción de biosurfactantes activos frente al lindano

La producción de sustancias exopolisacáridicas en respuesta al lindano, así como su actividad de emulsificación, se analizaron mediante una variante del protocolo previamente establecido (Anu Appaia & Karanth, 1991).

La presencia o no de biosurfactantes se determinó semicuantitativamente para dos condiciones diferentes. En primer lugar, las cepas I12, I16, e I19 fueron cultivadas individualmente en 45 mL de medio mineral BH (Bushnell-Haas Agar: 0,20 g/L de MgSO₄, 0,02 g/L de CaCl₂, 1,00 g/L de KH₂PO₄, 1,00 g/L de K₂HPO₄, 1,00 g/L de NH₄NO₃, 0,05 g/L de FeCl₃ y 20,00 g/L de agar en 1 L de agua destilada a pH 7,0) suplementado con 5 mL de una dilución de glucosa o manitol de 5 g/L y 150 µL de una dilución de 10.000 ppm de lindano (Sigma Aldrich, EE.UU.) en acetona (Labkem, España) para activar los procesos de emulsificación. En el segundo caso, las cepas fueron cultivadas en 30 mL de medio BH suplementado con 150 µL de la misma dilución de lindano como única fuente de carbono. Como controles negativos se utilizaron tres matraces con las mismas condiciones y sin inóculo bacteriano. Los cultivos se mantuvieron en un agitador rotatorio Incubator Shaker Series I26 (New Brunswick Scientific, EE.UU.) a 30 °C y 180 rpm durante 48 h. A continuación, se centrifugaron 10 mL de cada caldo de cultivo a 10.000 xg durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante.

Para el análisis de la actividad de emulsificación de cada una de las cepas, 200 µL de una dilución de lindano:acetona de 100.000 ppm se añadieron a 5 mL del sobrenadante y se agitaron al vórtex durante 1 minuto. Los tubos se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente para permitir que precipitara el exceso de pesticida. Finalmente, se decantó el

sobrenadante y se midió su densidad óptica a 660 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro DR 2800 (Hach-Lange, EE.UU.). La estabilidad de la emulsión se determinó visualmente por la presencia o no de turbidez en los tubos a las 24 horas.

RESULTADOS

1. Identificación funcional de genes implicados en la ruta de degradación de clorociclohexano

Los parámetros de calidad de ensamblaje obtenidos por QUASt para las tres cepas se recogen en la *Tabla 2*, donde N50 representa el tamaño de *contig* que, junto con otros de igual o mayor longitud, cubre el 50% del genoma; y L50 es un indicador del número más pequeño de *contigs* cuya suma de longitudes constituye la mitad del tamaño del genoma. Por otro lado, la representación estructural del genoma obtenida por Bandage muestra los *contigs* encontrados para cada una de las cepas y las posibles conexiones entre ellos (*véase Anexo II*). La cepa I19 contiene un plásmido (*véase Anexo II.c*) que incluye genes de resistencia a metales, metaloides y algunos antibióticos, sin presencia de genes implicados en la ruta de degradación de lindano (*véase Anexo II.d*).

Tabla 2. Estadísticas de calidad del ensamblaje de las lecturas genómicas para las cepas I12, I16 e I19.

CEPA	NÚMERO DE CONTIGS	LONGITUD TOTAL	% G+C	N50	L50
<i>Cupriavidus</i> cepa I12	178	8741184	65,70	113087	24
<i>Mesorhizobium</i> cepa I16	53	6589039	61,59	341354	8
<i>Sphingobium</i> cepa I19	67	4220746	65,3	200628	8

A continuación, se detalla la presencia o ausencia de genes *lin* involucrados en la degradación de lindano, según el archivo de información genómica obtenido por Bakta para cada una de las tres cepas. Asimismo, también se describe la presencia de otros genes partícipes en la ruta de degradación de clorociclohexano (CCH) y clorobenceno (CB) a partir de β - y γ - HCH descrita por la base de datos KEGG (del inglés, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (*véase Anexo III*).

Cupriavidus cepa I12

La cepa bacteriana I12 contiene únicamente los genes *linB* y *linF*, que codifican una haloalcano deshalogenasa y una maleilacetato reductasa, respectivamente; según la ruta original de degradación de lindano (Lal et al., 2010). Por otro lado, también están presentes las enzimas carboximetileno butenolidasa, clorofenol monooxigenasa, haloácido deshalogenasa y benceno 1,2-dioxigenasa, relacionadas con el metabolismo de otros compuestos clorados en la ruta de degradación. Finalmente, I12 posee los genes *catA*, *catE* y *bphC*, implicados en el metabolismo del catecol; y otros genes que codifican

enzimas encargadas de la producción de maleilacetato, como la 2-hidroxi-mucónico semialdehído deshidrogenasa y la hidroxiquinol 1,2-dioxigenasa (Tabla 3, Fig.6).

Tabla 3. Genes y enzimas implicados en la ruta de degradación de clorociclohexano y clorobenceno presentes en *Cupriavidus* cepa I12.

<i>Cupriavidus</i> cepa I12		
GEN	ENZIMA	FUNCIÓN EN LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE CCH Y CB
<i>lin B</i>	Haloalcano dehalogenasa	γ-HCH: 1,3,4,6-tetracloro-1,4-ciclohexadieno (1,4-TCDN) → 2,4,5-tricloro-2,5-ciclohexadieno-1-ol (2,4,5-DNOL) → 2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol (2,5-DDOL). β-HCH: β-HCH en 2,3,4,5,6 pentaclorociclohexanol (PCHL)
<i>catA</i>	Catecol 1,2-dioxigenasa	Tetraclorocatecol → tetracloro cis,cis-muconato. 4-clorocatecol → 3-cloro cis,cis-muconato
<i>catE</i>	Catecol 2,3-dioxigenasa	4-clorocatecol → 5-cloro-2-hidroxi-mucónico semialdehído
<i>clcD</i>	Carboximetileno butenolidasa	2,3,5-triclorodienolactona → 2,3,5-tricloromaleilacetato
		2,5-diclorocarboximetileno but-2-en-4-olido → 2,5-dicloro 4-ortohex-2-enedioato
		4-metilenebut-2-en-4-olido → cis-acetilacrilato
		Cis-4-carboximetilenebut-2-en-4-olido → maleilacetato
		Cis-2-cloro-dienolactona → 2-cloro-maleilacetato
<i>Tfd1/linF</i>	Maleilacetato reductasa	Trans-4-carboximetilene-but-2-en-4-olido → maleilacetato
		2,3,5-tricloromaleilacetato → 2,4-dicloro 3-oxoadipato
		2,5-dicloro 4-ortohex-2-enedioato → 2-cloro-3-oxoadipato
		2-cloro-maleilacetato → maleilacetato
<i>TftDC</i>	Clorofenol monooxigenasa	2,4,6-triclorofenol → 2,6-dicloro-p-benzoquinona
		2,6-diclorofenol → 2,6-diclorohidroquinona
		2,4,5-triclorofenol → 2,5-dicloro-p-benzoquinona
		2,5-diclorohidroquinona → 5-cloro-2-hidroxi-p-benzoquinona
<i>bphG</i>	2-hidroxi-mucónico semialdehído deshidrogenasa	Cis, trans-semialdehído hidroximucónico → maleilacetato
<i>chqB</i>	hidroxiquinol 1,2-dioxigenasa	1,2,4-bencenotriol → maleilacetato
-	haloácido deshalogenasa	Cloroacetato → glicolato
<i>bedC1</i>	Benceno 1,2-dioxigenasa	γ-HCH: Clorobenceno → 3-cloro-cis-1,2-dihidroxiciclohexa-3,5-dieno β-HCH: Benceno → cis-dihidrobencenodiol
<i>bphC</i>	Bifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenasa	3-clorocatecol → 3-cloro 2-hidroxi-mucónico semialdehído

Además de los ya mencionados, I12 posee otros genes que codifican enzimas con funciones similares a las proteínas Lin, pero cuya pertenencia a la ruta no ha sido confirmada todavía. Tal es el caso de las enzimas 5-CHQ deshidroclorinasa incluida dentro de la superfamilia enzimática YciI, y la 5-cloro-2-hidroxi-hidroquinona deshidroclorinasa TffG, que podrían realizar la función deshidroclorinasa de LinB. También se han descrito dos dioxigenasas de rotura anular y un regulador transcripcional de la familia LysR, que podrían pertenecer a los genes *linE* y *linR*, respectivamente. Finalmente, I12 contiene enzimas más generales como la 3-oxoadipato-coA transferasa y

la β -cetoadipil-coA tiolasa, codificadas por los genes *pcaJ* y *pcaF*, muy similares a LinGH y LinJ, y cuya transcripción estaría controlada por un regulador transcripcional de la familia IclR o LinI, también presente en el genoma (Fig.6).

I12

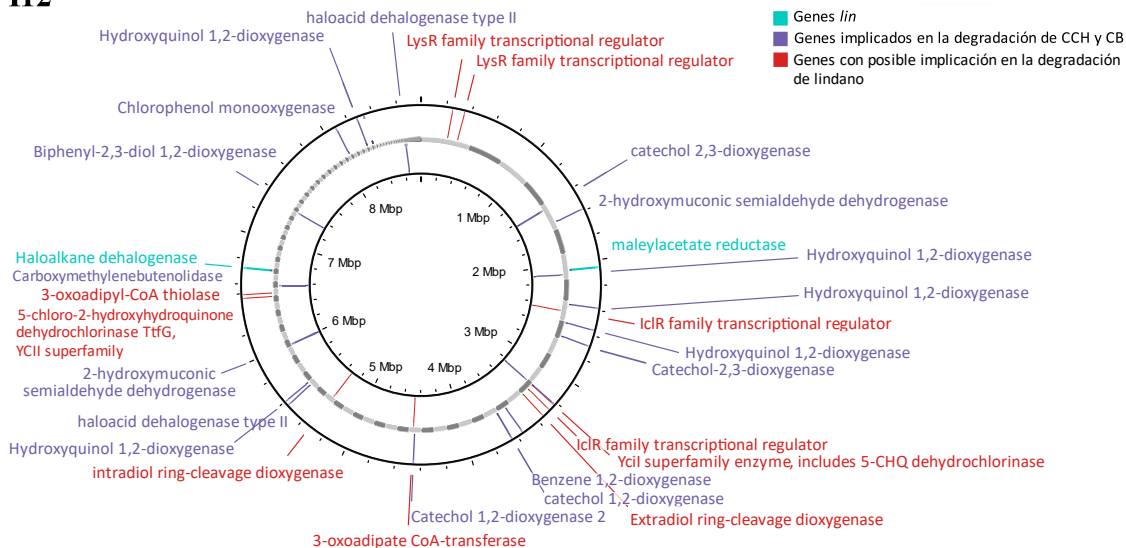


Figura 6. Disposición de los genes responsables de las enzimas implicadas en la degradación de γ -hexaclorociclohexano, clorociclohexano y clorobenceno en el genoma de *Cupriavidus* cepa I12.

Mesorhizobium cepa I16

La cepa bacteriana I16 contiene la enzima 2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol deshidrogenasa, producto del gen *linX* según la base de datos UniProt. Del mismo modo que en I12, *catE* codifica una catecol 2,3-dioxygenasa, encargada de la producción de 5-cloro-2-HMSA a partir de 4-clorocatecol. Por último, I16 posee también enzimas partícipes en el metabolismo de otros compuestos clorados en la ruta de degradación de clorociclohexano y clorobenceno, como las enzimas cis-1,2-dihidrobenceno-1,2-diol deshidrogenasa, cloromuconato cicloisomerasa, carboximetileno butenolidasa y 2-haloácido deshalogenasa (Tabla 4, Fig.7).

Tabla 4. Genes y enzimas implicados en la ruta de degradación de clorociclohexano y clorobenceno presentes en *Mesorhizobium* cepa I16.

<i>Mesorhizobium</i> cepa I16		
GEN	ENZIMA	FUNCIÓN EN LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE CCH Y CB
<i>linX</i>	2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol deshidrogenasa	2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol (2,5-DDOL) \rightarrow 2,5-diclorohidroquinona (2,5-DCHQ)
<i>todD</i>	1,2-dihidrobenceno-1,2-diol deshidrogenasa	β -HCH: cis-dihidrobencenodiol \rightarrow catecol
		γ -HCH: 3-cloro-cis-1,2-dihidroxiciclohexa-2,5-dieno \rightarrow 3-clorocatecol 3,6-dicloro-cis-1,2-dihidroxiciclohexa-3,5-dieno \rightarrow 3,6-diclorocatecol

		3,4,6-tricloro-cis-1,2-dihidroxiciclohexa-3,5-dieno → 3,4,6-triclorocatecol
catE	Catecol 2,3-dioxigenasa	4-clorocatecol → 5-cloro-2-hidroxiacético semialdehído
		2-cloro-cis,cis-muconato → trans-4-carboximetileno-but-2-en-4-olido
		2,5-dicloro-cis,cis-muconato → trans-2-clorodienolactona
tfdD1	Cloromuconato cicloisomerasa	3-cloro-cis,cis-muconato → 2-cloro-5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-acetato
		2,3,5-tricloro-cis,cis-muconato → 2,5-dicloro carboximetileno-but-2-en-4-olido
		Tetracloro-cis,cis-muconato → 2,3,5-triclorodienolactona
		2,3,5-triclorodienolactona → 2,3,5-tricloromaleilacetato
		2,5-diclorocarboximetileno but-2-en-4-olido → 2,5-dicloro 4-orto-hex-2-enedioato
clcD	Carboximetileno butenolidasa	4-metileno-but-2-en-4-olido → cis-acetilacrilato
		Cis-4-carboximetileno-but-2-en-4-olido → maleilacetato
		Cis-2-cloro-dienolactona → 2-cloro-maleilacetato
		Trans-4-carboximetileno-but-2-en-4-olido → maleilacetato
-	2-haloácido deshalogenasa	Cloroacetato → glicolato

Al margen de los genes confirmados en la *Tabla 4*, I16 contiene una dioxigenasa de rotura anular, que podría relacionarse con LinE; y la enzima 3-oxoadipato-coA transferasa, muy similar a LinGH. Asimismo, dentro del genoma están codificados dos reguladores transcripcionales pertenecientes a las familias LysR e IclR, que podrían ejercer las funciones de LinR y LinI, respectivamente, en caso de existir los genes bajo su control (*Fig.7*).

I16

■ Genes *lin*

■ Genes implicados en la degradación de CCH y CB

■ Genes con posible implicación en la degradación de lindano

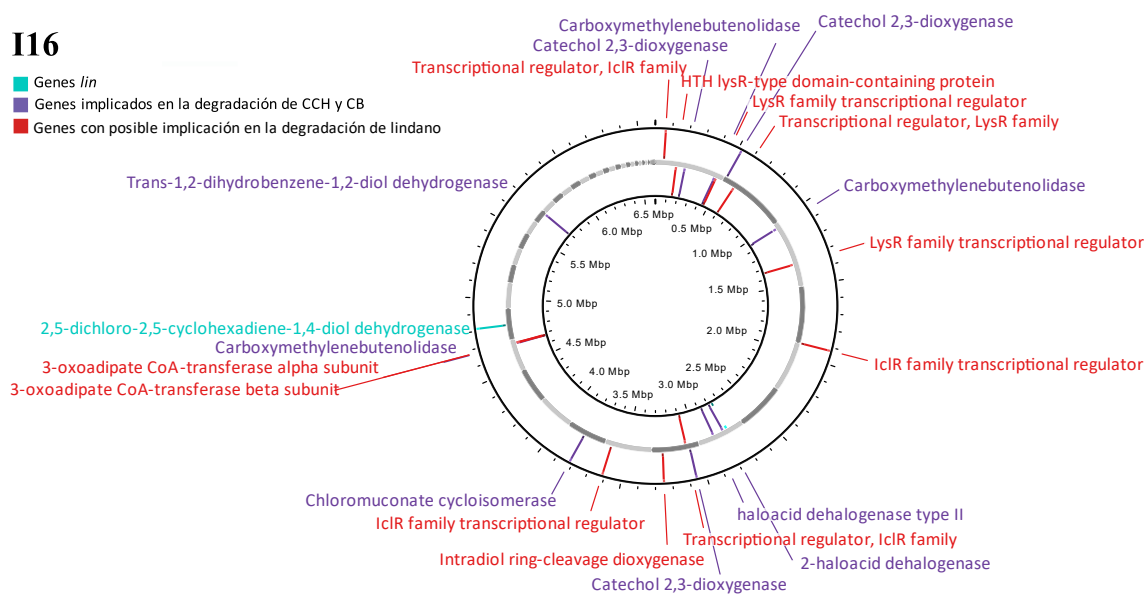


Figura 7. Disposición de los genes responsables de las enzimas implicadas en la degradación de γ -hexaclorociclohexano, clorociclohexano y clorobenceno en el genoma de *Mesorhizobium* cepa I16.

Sphingobium cepa I19

La cepa bacteriana I19 contiene todos los genes *lin* implicados en la ruta ascendente de degradación de lindano: *linA2* y *linB*, que codifican una γ -hexaclorociclohexano deshidroclorinasa y una haloalcano deshalogenasa, respectivamente; así como tres enzimas 2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol deshidrogenasas, que se corresponden con los genes *linC*, *linX* y *linX2*. Asimismo, también están presentes los genes *linE* y *linF*, pertenecientes a la ruta descendente de degradación, y el gen *linL*, que codifica el componente ATPasa del sistema transportador de tipo ABC; además de los reguladores transcripcionales codificados por los genes *linR* y *linI*. Por último, I19 posee otros genes ya mencionados, como *clcD*, *bphG* y *catE*, responsables de las enzimas carboximetileno butenolidasas, 2-hidroxiacético semialdehído deshidrogenasa y catecol 2,3-deshidrogenasa, respectivamente (Tabla 5, Fig.8).

Tabla 5. Genes y enzimas implicados en la ruta de degradación de clorociclohexano y clorobenceno presentes en *Sphingobium cepa* I19.

<i>Sphingobium cepa</i> I19		
GEN	ENZIMA	FUNCIÓN EN LA RUTA DE DEGRADACIÓN DE CCH Y CB
<i>linA2</i>	γ -HCH deshidroclorinasa	γ -hexaclorociclohexano (γ -HCH) \rightarrow γ -pentaclorociclohexano (γ -PCCH) γ -pentaclorociclohexano (γ -PCCH) \rightarrow 1,3,4,6-tetracloro-1,4-ciclohexadieno (1,4-TCDN)
<i>linB</i>	Haloalcano dehalogenasa	γ -HCH: 1,3,4,6-tetracloro-1,4-ciclohexadieno (1,4-TCDN) \rightarrow 2,4,5-tricloro-2,5-ciclohexadieno-1-ol (2,4,5-DNOL) \rightarrow 2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol (2,5-DDOL). β -HCH: transforma el β -HCH en 2,3,4,5,6-pentaclorociclohexanol (PCHL)
<i>linC</i>	2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol deshidrogenasa	2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol (2,5-DDOL) \rightarrow 2,5-diclorohidroquinona (2,5-DCHQ)
<i>linX</i>		
<i>linX2</i>		
<i>linE</i>	Clorohidroquinona/hidroquinona 1,2-dioxigenasa	Clorohidroquinona \rightarrow acilcloruro Hidroquinona \rightarrow cis,trans-hidroxiacético semialdehído (HMSA)
<i>linR</i>	Regulador transcripcional tipo HTH	Regula positivamente la transcripción de los genes <i>linD</i> y <i>linE</i>
<i>Tfd1/linF</i>	Maleilacetato reductasa	2,3,5-tricloromaleilacetato \rightarrow 2,4-dicloro 3-oxoadipato 2,5-dicloro 4-ortohex-2-enedioato \rightarrow 2-cloro-3-oxoadipato 2-cloro-maleilacetato \rightarrow maleilacetato
<i>linI</i>	Regulador transcripcional de unión a DNA	Regula positivamente la transcripción de los genes <i>linGH</i> y <i>linJ</i>
<i>linL</i>	Componente ATPasa del sistema transportador ABC	Componente del sistema ABC para la utilización de γ -hexaclorociclohexano
<i>clcD</i>	Carboximetileno butenolidasas	2,3,5-triclorodienolactona \rightarrow 2,3,5-tricloromaleilacetato
		2,5-diclorocarboximetileno but-2-en-4-olido \rightarrow 2,5-dicloro 4-ortohex-2-enedioato
		4-metilenebut-2-en-4-olido \rightarrow cis-acetilacrilato Cis-4-carboximetilenebut-2-en-4-olido \rightarrow maleilacetato

		Cis-2-cloro-dienolactona → 2-cloro-maleilacetato
		Trans-4-carboximetilene-but-2-en-4-olido → maleilacetato
bphG	2-hidroximucónico semialdehído deshidrogenasa	Cis, trans-semialdehído hidroximucónico → maleilacetato
catE	Catecol 2,3-dioxigenasa	4-clorocatecol → 5-cloro-2-hidroximucónico semialdehído

Al igual que en las cepas anteriores, el genoma de I19 codifica otras enzimas muy similares a las proteínas Lin, tales como la 5-CHQ-deshidroclorinasa, incluida dentro de la superfamilia enzimática YciI, y la 3-oxoadipato-coA transferasa, que podrían desempeñar las mismas funciones que LinD y LinGH, respectivamente. Además, también se han encontrado los componentes permeasa, proteína periplásmica y lipoproteína del sistema transportador ABC, que podrían identificarse con los genes *linK*, *linM* y *linN* para, junto con LinL, facilitar la utilización del γ -HCH por parte de las células (Fig.8).

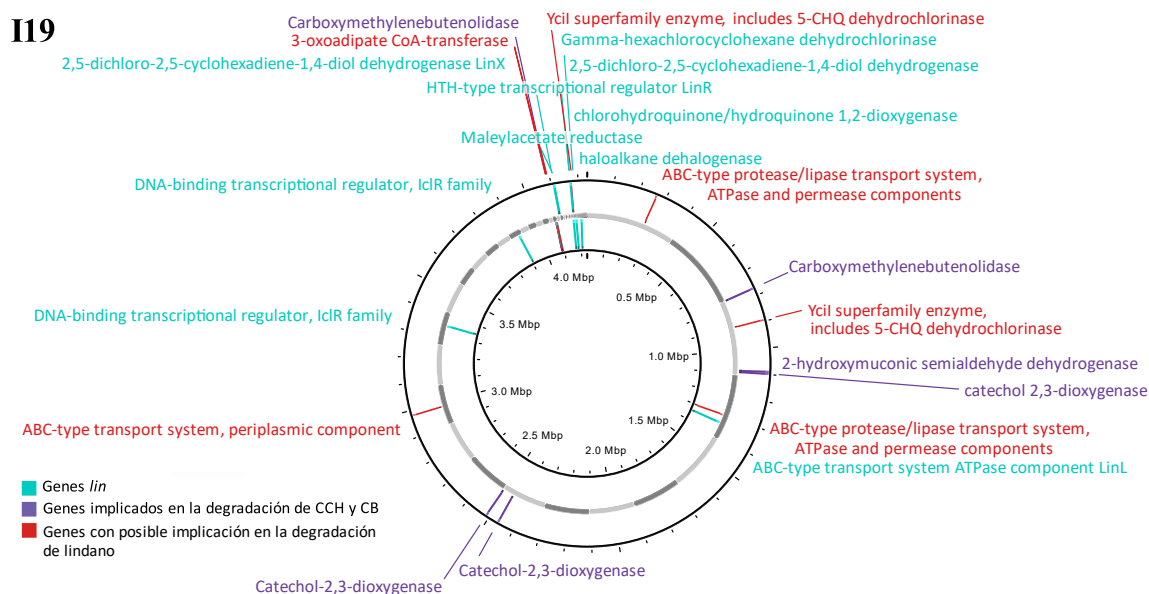


Figura 8. Disposición de los genes responsables de las enzimas implicadas en la degradación de γ -hexaclorociclohexano, clorociclohexano y clorobenceno en el genoma de *Sphingobium* cepa I19.

En lo relacionado a la localización, los genes *linA*, *linX* y *linX2* se sitúan dentro del mismo *contig*, nombrado como NODE_27_length_16915 (Fig.9A). Por otro lado, los genes *linE*, *linR* y la 5-CHQ deshidroclorinasa perteneciente a la superfamilia enzimática YciI se encuentran en el *contig* NODE_35_length_5289 (Fig. 9B). La cercanía de estos tres genes podría indicar que efectivamente se trata de *linD* y que, junto con *linE*, se encuentra bajo el control del regulador transcripcional LinR dentro del operón *linRED*.

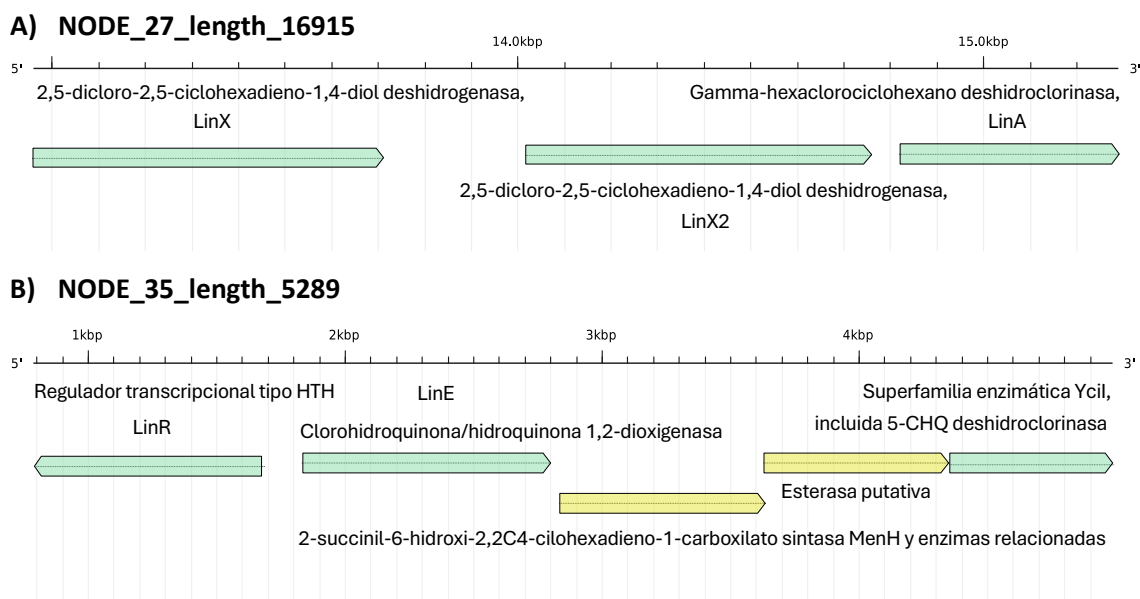


Figura 9. Representación esquemática de la localización de ciertos genes *lin* dentro del genoma de *Sphingobium* cepa I19. (A) Genes *linA*, *linX* y *linX2* localizados en el *contig* NODE_27_length_16915 (B) Genes *linR*, *linE* y superfamilia enzimática YciI localizados en el *contig* NODE_35_length_5289.

Consortio bacteriano I12/I16/I19

A excepción de LinD, cuya presencia no está confirmada a pesar de que *Cupriavidus* cepa I12 y *Sphingobium* cepa I19 contienen enzimas con funciones similares, el conjunto de las tres cepas posee todas las enzimas de la ruta de degradación de γ -hexaclorociclohexano hasta maleilacetato, un compuesto metabolizable por la vía del benzoato hasta acetyl-coA y succinil-coA. Por otro lado, existen ramificaciones de la ruta principal a partir de compuestos como el 1,3,4,6-tetracloro-1,4-ciclohexadieno, 1,2,4-triclorobenceno, 1,4-diclorobenceno y 2,5-diclorohidroquinona. En todos estos casos se han descrito enzimas presentes en, al menos, una de las tres cepas, capaces de metabolizar dichos compuestos hasta cloroacetato, succinato y maleilacetato, que entrarán al metabolismo del glioxilato, el ciclo del citrato, y la ya mencionada degradación del benzoato, respectivamente (*Fig.10*).

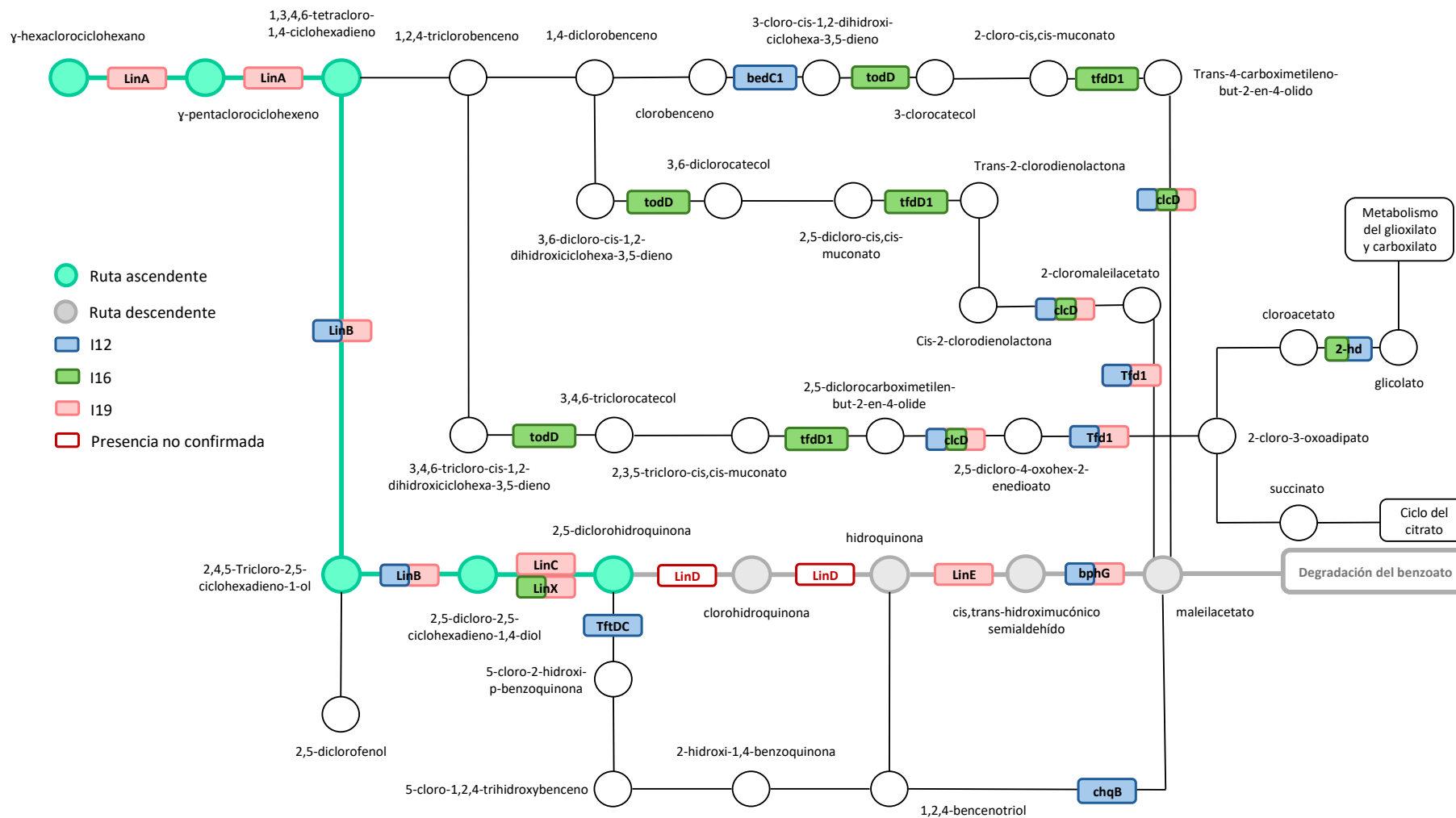


Figura 10. Ruta de degradación de γ -hexaclorociclohexano por las enzimas presentes en el consorcio formado por las cepas bacterianas I12, I16 e I19.

2. Análisis de la producción de biosurfactantes en respuesta al lindano

Puesto que el lindano es un hidrocarburo no soluble en agua, en condiciones normales se produce su rápida precipitación al fondo del recipiente. Sin embargo, la presencia de surfactantes activos frente a este compuesto favorece su emulsificación, manteniendo una mayor parte de él a flote. Visualmente, esto se traduce en una menor cantidad de lindano sólido en el fondo del tubo y una mayor turbidez de la disolución, que puede cuantificarse midiendo su absorbancia en un espectrofotómetro.

Las tres cepas bacterianas crecidas en presencia de **lindano** como única fuente de carbono muestran resultados positivos tanto visuales como de absorbancia a las 48 h de cultivo, en comparación con los resultados obtenidos para el control negativo (*Tabla 6, Fig.11a*). De todas ellas, *Cupriavidus* cepa I12 presenta una mayor turbidez y, por tanto, unos valores de absorbancia más altos, indicando una mayor emulsión de lindano.

En presencia de **manitol y lindano** como fuentes de carbono, *Cupriavidus* cepa I12 muestra una absorbancia ligeramente superior a la del control negativo lo que, junto a la turbidez presente en el tubo, se interpreta como un resultado positivo. Por otro lado, los resultados obtenidos para *Mesorhizobium* cepa I16 son claramente positivos transcurridos 2 días de cultivo, siendo la única cepa capaz de mantener la estabilidad de la emulsión a las 24 horas. Finalmente, a pesar de la mucha turbidez observada para *Sphingobium* cepa I19, esta se encontraba en la parte superior del tubo, siendo no accesible para el haz de medida del espectrofotómetro (*Tabla 6, Fig.11b*).

La producción de biosurfactantes en presencia de **glucosa y lindano** como fuentes de carbono es ligera y únicamente positiva para *Cupriavidus* cepa I12, siendo capaz de mantener la emulsión estable a las 24 horas (*Tabla 6, Fig.11*).

Tabla 6. Resultados del análisis de producción de biosurfactantes para *Cupriavidus* cepa I12, *Mesorhizobium* cepa I16 y *Sphingobium* cepa I19 y sus respectivos controles. N/A: no disponible, no corresponde.

	CEPAS	ABS	INFORMACIÓN VISUAL	EMULSIFICACIÓN	ESTABILIDAD
BH+ LINDANO	Control	0,154	Precipitación del lindano sólido No turbidez por emulsificación	Negativa	N/A
	I12	0,441	Precipitación de gran parte del lindano sólido. Mucha turbidez por emulsión	Positiva	N/A
	I16	0,279	Precipitación de gran parte del lindano sólido. Turbidez por emulsificación	Positiva	N/A
	I19	0,312	Precipitación de gran parte del lindano sólido. Turbidez por emulsificación	Positiva	N/A
BH + MANITOL + LINDANO	Control	0,052	Precipitación del lindano sólido No turbidez por emulsificación	Negativa	N/A
	I12	0,056	Precipitación del lindano sólido Poca turbidez por emulsión	Positiva	No
	I16	0,143	Precipitación de gran parte del lindano sólido. Turbidez por emulsión que se mantiene a las 24 h	Positiva	Si
	I19	N/A	Precipitación del lindano sólido Mucha turbidez por emulsión en la parte superior del tubo, no accesible para la medición.	N/A	N/A
BH + GLUCOSA + LINDANO	Control	0,073	Precipitación del lindano sólido No turbidez por emulsificación	Negativa	N/A
	I12	0,079	Precipitación del lindano sólido Muy poca turbidez por emulsión que se mantiene a las 24 h	Positiva	Si
	I16	0,060	Precipitación del lindano sólido No turbidez por emulsificación	Negativa	N/A
	I19	0,050	Precipitación del lindano sólido No turbidez por emulsificación	Negativa	N/A



Figura 11. Resultados visuales obtenidos para *Cupriavidus* cepa I12, *Mesorhizobium* cepa I16 y *Sphingobium* cepa I19 y sus respectivos controles a diferentes condiciones de crecimiento: (a) crecimiento durante 48h en presencia de BH+lindano (b) crecimiento durante 48h en presencia de BH +glucosa/manitol + lindano.

DISCUSIÓN

La remediación de los suelos contaminados con γ -hexaclorociclohexano y otros isómeros es fundamental para prevenir la migración de dichos compuestos a otros emplazamientos ambientales y su bioacumulación en la cadena alimentaria (Boudh et al., 2017). El metabolismo del lindano está condicionado por las reacciones de eliminación de los átomos de cloro de la molécula, lo que se refleja en la complejidad y longitud de la ruta de degradación microbiana compuesta por los genes *lin* (Lal et al., 2010). Con el fin de profundizar en las posibles alternativas en la ruta de degradación de lindano, se ha llevado a cabo un estudio detallado de los genes potencialmente relacionados con dicha ruta.

Además de las primeras cepas bacterianas estudiadas *Sphingobium japonicum* UT26, *Sphingobium indicum* B90A y *Sphingobium francense* Sp+ (Lal et al., 2010), se ha descrito una gran variedad de microorganismos con potencial catabólico frente a estos compuestos y un amplio rango de supervivencia en ambientes contaminados (Boudh et al., 2017). Otros autores (Kumar et al., 2016) mostraron que las cepas bacterianas *Kocuria* sp. DAB-1Y y *Staphylococcus* sp. DAB-1W eran capaces de degradar el 84% y 98% de lindano, respectivamente, tras 8 días en cultivo líquido. En un trabajo anterior del Grupo de Bioquímica Ambiental y Materias Primas Minerales de la Universidad de Oviedo se utilizaron cultivos de enriquecimiento con lindano para el aislamiento de distintas bacterias de los géneros *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Pseudomonas*, *Cupriavidus* y *Sinorhizobium*, procedentes de un emplazamiento contaminado con lindano en Sabiñánigo (Huesca), aunque no se llegaron a caracterizar con detalle (Menendez et al., 2016). La capacidad de *Cupriavidus maysiensis* de degradar simultáneamente el 87% de los cuatro isómeros principales de t-HCH, especialmente β -HCH, después de un proceso de aclimatación, ha sido también descrita por otros autores (Srivastava et al., 2022). Otros géneros bacterianos, como *Microbacterium* sp. P27 y *Paracoccus* sp. NITDBR1, fueron capaces de eliminar aproximadamente un 83% y 90% de lindano, respectivamente, así como de promover el crecimiento vegetal (Singh & Singh, 2019; Sahoo et al., 2019). Finalmente, la levadura *Candida* VITJzN04 mostró un 78% de degradación de lindano en suelos de jardín en cultivos de 30 días (Salam et al., 2017).

La existencia del sistema *lin* no sólo en bacterias del género *Sphingobium* sino en muchas otras especies, sugiere una transferencia horizontal de la capacidad degradadora de HCH. De hecho, en la gran mayoría de cepas los genes específicos *linA* a *linF* aparecen bien asociados a secuencias de inserción IS6100, o bien localizados en plásmidos (Lal et al., 2010; Nagata et al., 2019; Tabata et al., 2011). Por otro lado, la diferente organización de dichos genes en los distintos genomas apunta a la adquisición independiente de muchos de ellos (Nagata et al., 2007).

Las cepas bacterianas I12, I16 e I19 pertenecen a los géneros *Cupriavidus*, *Mesorhizobium* y *Sphingobium*, respectivamente, que han sido descritos como degradadores de lindano en trabajos anteriores (García Monte, 2022; Menéndez et al., 2016; Nagata et al., 2019; Srivastava et al., 2022). La capacidad de estas cepas para reducir la concentración de lindano en cultivo debe estar motivada, entre otros factores, por la presencia de elementos genéticos y rutas enzimáticas de degradación, investigadas en el presente trabajo.

De todos los genes *lin* implicados en la degradación de γ -hexaclorociclohexano, *Cupriavidus* cepa I12 contiene *linB* y *linF*, que codifican una haloalcano deshalogenasa y una maleilacetato reductasa, respectivamente. La presencia de dichos genes en *Mesorhizobium* cepa I16 es extremadamente escasa, estando presente sólo el gen *linX*, que codifica la enzima 2,5-dicloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diol deshidrogenasa. Por el contrario, *Sphingobium* cepa I19 posee todos los genes *lin* de la ruta ascendente de degradación, así como los genes *linE* y *linF* de la ruta descendente, los reguladores transcripcionales *linR* y *linI*, y el gen *linL* perteneciente al sistema transportador de tipo ABC. El hecho de que I19 contenga prácticamente todos los genes *lin* puede explicarse por su identificación con *Sphingobium indicum* B90A, capaz de degradar hasta cuatro isómeros de HCH, utilizándose como control en los ensayos de degradación de lindano (Nagata et al., 2019). Por otro lado, la ausencia de la gran mayoría de genes *lin* en I12 e I16 podría relacionarse con la posible pérdida de dichos genes, que ya ha sido descrita en cepas como *Sphingobium japonicum* UT26 (Kumari et al., 2002). Dicha ausencia podría estar relacionada con una menor degradación de lindano por parte de *Cupriavidus* cepa I12 y *Mesorhizobium* cepa I16 en comparación con *Sphingobium* cepa I19. Las tres cepas poseen también enzimas implicadas en las ramificaciones de la ruta principal de degradación de γ -hexaclorociclohexano, como la carboximetileno butenolidasa codificada por el gen *clcD*. Asimismo, sus genomas codifican otras enzimas con

funciones muy similares a los genes *lin* pero cuya relación no se ha confirmado. Tal es el caso de las enzimas 5-CHQ deshidroclorinasa, presente en I12 e I19, y 3-oxoadipato-coA transferasa, que podrían cubrir las funciones de LinD y LinGH, respectivamente. La ausencia de otras enzimas necesarias en la ruta puede explicarse, bien por reacciones espontáneas de conversión de los compuestos, o bien por la existencia de enzimas más generales capaces de catalizar dichas reacciones pero que no han sido descritas en la base de datos KEGG. Finalmente, el consorcio microbiano de I12, I16 e I19 permitiría compensar la falta de determinados genes al estar presentes, en la mayoría de los casos, en alguna de las otras cepas, completando así la ruta metabólica.

Además de la presencia enzimática, la degradación de lindano está condicionada por su biodisponibilidad en el medio. El lindano es un compuesto muy poco soluble en fase acuosa, tendiendo a la partición en la fase orgánica del suelo y haciéndolo menos accesible a los microorganismos del entorno. La producción de bioemulsionantes actúa como mecanismo auxiliar, mejorando dicha disponibilidad y aumentando su degradación (Sahoo et al., 2019). Así, la combinación de bacterias degradadoras de HCH junto con la producción de biosurfactantes es especialmente interesante en la degradación de contaminantes altamente hidrofóbicos como el lindano (Alvarez et al., 2022).

El análisis de producción de biosurfactantes en las cepas I12, I16 e I19 muestra resultados prometedores, ya que las tres cepas son capaces de emulsionar el lindano en, al menos, una de las tres condiciones estudiadas. Son especialmente notables las diferencias obtenidas en presencia de glucosa y manitol, indicando que la fuente de carbono disponible puede influir en la emulsión del hidrocarburo. Finalmente, las cepas I12 e I16, aunque muestran menor porcentaje de degradación, producen biosurfactantes en mayor medida, lo que puede ayudar a la emulsión de lindano en consorcio, favoreciendo su disponibilidad para bacterias mayormente degradadoras, como I19.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, los resultados obtenidos en este trabajo ofrecen perspectivas de utilización conjunta de las cepas I12, I16 e I19 como una herramienta útil en la recuperación de emplazamientos contaminados con lindano. Finalmente, la degradación de lindano a través de los mecanismos estudiados puede ser potenciada en combinación con otras aproximaciones, como la síntesis de enzimas libres mediante ingeniería genética, la nanotecnología y/o las interacciones entre plantas y microorganismos (Zhang et al., 2020). Dichas tecnologías pueden utilizarse para lograr

una descontaminación rápida del lindano presente en suelos y aguas e, incluso, extrapolar su alcance a otros isómeros como α - y β -HCH, también problemáticos y recalcitrantes. De hecho, en el trabajo del Grupo BIOGEOAMB mencionado previamente (Menéndez et al. 2016) el tratamiento con nanopartículas de hierro cerovalente (nZVI), solas, combinadas con *Arthrobacter*, o con un consorcio de *Arthrobacter* y *Cupriavidus*, se mostró efectivo para la eliminación de lindano. La caracterización genética de las bacterias estudiadas en el presente trabajo abre la interesante posibilidad de profundizar y optimizar esas estrategias para su implementación *in situ* o *ex situ* en los suelos contaminados.

CONCLUSIONES

1. La presencia de genes *lin* involucrados en la ruta principal de degradación de γ -hexaclorociclohexano se ha confirmado en las cepas bacterianas I12, I16 e I19; así como de otros genes relacionados con el metabolismo de clorociclohexano y clorobenceno. El consorcio de las tres cepas contiene la ruta metabólica prácticamente completa, siendo por tanto esta combinación una herramienta prometedora en la remediación de emplazamientos contaminados con lindano. Las peculiaridades y limitaciones genéticas observadas en cada cepa explican las diferentes tasas de degradación del lindano.
2. Las tres cepas, especialmente I12 e I16, producen sustancias biosurfactantes capaces de emulsionar el lindano en cultivo, mejorando su biodisponibilidad. Por lo tanto, su combinación con *Sphingobium* I19 podría potenciar en la práctica la degradación de lindano.
3. Las bacterias estudiadas se están ensayando en la actualidad, tanto individualmente como en consorcio en cultivos y microcosmos de laboratorio para corroborar su utilidad en la biorremediación de suelos contaminados con lindano.

REFERENCIAS

- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., & Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)
- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402.
<https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Alvarez, A., Rodríguez-Garrido, B., Cerdeira-Pérez, A., Tomé-Pérez, A., Kidd, P., & Prieto-Fernández, A. (2022). Enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers by *Sphingobium sp.* strain D4 in the presence of root exudates or in co-culture with HCH-mobilizing strains. *Journal of Hazardous Materials*, 433.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128764>
- Anu Appaia, K. A., & Karanth, N. G. K. (1991). Insecticide specific emulsifier production by hexachlorocyclohexane utilizing *Pseudomonas tralucida* Ptm+ strain. *Biotechnology Letters*, 13(5), 1–374.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01027685>
- Boudh, S., Tiwari, S., & Singh, J. S. (2017). Microbial-mediated lindane bioremediation. In *Agro-Environmental Sustainability* (Vol. 2, pp. 213–233). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49727-3_11
- Castellanos Rozo, J., & Rache Cardenal, L. Y. (2013). Microorganismos, enzimas, plásmidos y genes involucrados en la degradación de plaguicidas N-metil carbamatos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 105–119.
- Chen, S. (2023). Ultrafast one-pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication using fastp. *IMeta*, 2(2). <https://doi.org/10.1002/imt2.107>
- García Monte, I. (2022). *Análisis de poblaciones microbianas en muestras ambientales*. Peláez Andrés, Ana Isabel (dir). Trabajo de fin de Grado. Universidad de Oviedo, 18-07-2022.
- González De Figueras, C. (2020). *Construcción de una planta transgénica de Arabidopsis thaliana que expresa una declorinasa bacteriana y que elimina, y degrada el pesticida lindano*. González Pastor, Jose Eduardo (dir). Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Grant, J. R., Enns, E., Marinier, E., Mandal, A., Herman, E. K., Chen, C.-Y., Graham, M., Van Domselaar, G., & Stothard, P. (2023). Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 51(1), 484–492.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1093/nar/gkad326>

- Gremme, G., Steinbiss, S., & Kurtz, S. (2013). GenomeTools: A Comprehensive Software Library for Efficient Processing of Structured Genome Annotations. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, *10*(3), 645–656. <https://doi.org/https://doi.org/10.1109/TCBB.2013.68>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, *29*(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- KEGG [Base de datos]. (2024). *Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation - Reference pathway*. <https://www.genome.jp/pathway/map00361+K15236>
- Kumar, D., Kumar, A., & Sharma, J. (2016). Degradation study of lindane by novel strains *Kocuria sp.* DAB-1Y and *Staphylococcus sp.* DAB-1W. *Bioresources and Bioprocessing*, *3*(53). <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s40643-016-0130-8>
- Kumar, D., & Pannu, R. (2018). Perspectives of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) biodegradation from the environment: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, *5*(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0213-9>
- Kumari, R., Subudhi, S., Suar, M., Dhingra, G., Raina, V., Dogra, C., Lal, S., Van der Meer, J. R., Holliger, C., & Lal, R. (2002). Cloning and characterization of lin genes responsible for the degradation of hexachlorocyclohexane isomers by *Sphingomonas paucimobilis* strain B90. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(12), 6021–6028. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6021-6028.2002>
- Lal, R., Pandey, G., Sharma, P., Kumari, K., Malhotra, S., Pandey, R., Raina, V., Kohler, H.-P. E., Holliger, C., Jackson, C., & Oakeshott, J. G. (2010). Biochemistry of microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(1), 58–80. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00029-09>
- Loomis, D., Guyton, K., Grosse, Y., El Ghissasi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H., & Straif, K. (2015). Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *The Lancet Oncology*, *16*(8), 891–892. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00081-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00081-9)
- Madaj, R., Sobiecka, E., & Kalinowska, H. (2018). Lindane, kepone and pentachlorobenzene: chloropesticides banned by Stockholm convention. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *15*(2), 471–480. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1417-9>
- Menéndez A.V., Osuna L.R., Mesa.V., Gallego J.L.R., Sastre H., Peláez A.I. (2016). Aerobic degradation of lindane in the presence of bacteria and zero valent iron nanoparticles. *Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms*. A. Méndez-Vilas (ed.), Brown Walker Press, pp: 7-12. ISBN-10: 1-62734-612-0; ISBN-13: 978-1-62734-612-2

- Nagata, Y., Endo, R., Ito, M., Ohtsubo, Y., & Tsuda, M. (2007). Aerobic degradation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(4), 741–752.
<https://doi.org/10.1007/s00253-007-1066-x>
- Nagata, Y., Kato, H., Ohtsubo, Y., & Tsuda, M. (2019). Lessons from the genomes of lindane-degrading sphingomonads. In *Environmental Microbiology Reports* (Vol. 11, Issue 5, pp. 630–644). Wiley-Blackwell.
<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12762>
- Nolan, K., Kamrath, J., & Levitt, J. (2012). Lindane toxicity: A comprehensive review of the medical literature. *Pediatric Dermatology*, 29(2), 141–146.
<https://doi.org/10.1111/j.1525-1470.2011.01519.x>
- Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., & Korobeynikov, A. (2020). Using SPAdes De Novo Assembler. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70(1).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
- Sahoo, B., Ningthoujam, R., & Chaudhuri, S. (2019). Isolation and characterization of a lindane degrading bacteria *Paracoccus* sp. NITDBR1 and evaluation of its plant growth promoting traits. *International Microbiology*, 22(1), 155–167.
<https://doi.org/10.1007/s10123-018-00037-1>
- Salam, J. A., Hatha, M. A. A., & Das, N. (2017). Microbial-enhanced lindane removal by sugarcane (*Saccharum officinarum*) in doped soil-applications in phytoremediation and bioaugmentation. *Journal of Environmental Management*, 193, 394–399.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.02.006>
- Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M. A., Beyvers, S., Blom, J., & Goesmann, A. (2021). Bakta: Rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial Genomics*, 7(11).
<https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000685>
- Sharma, S., Singh, P., Raj, M., Chadha, B. S., & Saini, H. S. (2009). Aqueous phase partitioning of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers by biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* WH-2. *Journal of Hazardous Materials*, 171(1–3), 1178–1182. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.116>
- Singh, T., & Singh, D. K. (2019). Rhizospheric Microbacterium sp. P27 showing potential of lindane degradation and plant growth promoting traits. *Current Microbiology*, 76, 888–895. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00284-019-01703-x>
- Srivastava, V., Dhuliya, S., & Kumar, M. S. (2022). Biodegradation of technical hexachlorocyclohexane by *Cupriavidus malaysiensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(108).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11274-022-03284-7>

- Tabata, M., Endo, R., Ito, M., Ohtsubo, Y., Kumar, A., Tsuda, M., & Nagata, Y. (2011). The lin genes for γ -hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas* sp. MM-1 proved to be dispersed across multiple plasmids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75(3), 466–472. <https://doi.org/10.1271/bbb.100652>
- Usmani, Z., Kulp, M., & Lukk, T. (2021). Bioremediation of lindane contaminated soil: Exploring the potential of actinobacterial strains. *Chemosphere*, 278. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130468>
- Varela-Castejón, C., & Martínez Lozano, F. (2008). Antecedentes históricos sobre la contaminación por lindano en O Porriño (Pontevedra). *Edafología*, 15(1,2,3), 25–32.
- Varela-Castejón, C., Martínez Lozano, F., & Blasco Herguedas, Ó. (2008). Investigación y confinamiento de suelos contaminados por hexaclorociclohexano en el Polígono de Torneiros - O Porriño - (Pontevedra). *Edafología*, 15(1,2,3), 33–52.
- Vega, M., Romano, D., & Uotila, E. (2016). *Lindane (persistent organic pollutant) in the EU*.
- Vijgen, J., Abhilash, P. C., Li, Y. F., Lal, R., Forter, M., Torres, J., Singh, N., Yunus, M., Tian, C., Schäffer, A., & Weber, R. (2011). Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs-a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(2), 152–162. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0417-9>
- Wick, R. R., Schultz, M. B., Zobel, J., & Holt, K. E. (2015). Bandage: Interactive visualization of de novo genome assemblies. *Bioinformatics*, 31(20), 3350–3352. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv383>
- Zhang, W., Lin, Z., Pang, S., Bhatt, P., & Chen, S. (2020). Insights into the biodegradation of lindane (γ -Hexachlorocyclohexane) using a microbial system. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00522>

ANEXOS

Anexo I: Comandos bioinformáticos utilizados en el procesamiento de las secuencias y anotación genómica

a. Fastp

```
fastp --in1 <lecturas directas> --in2 <lecturas reversas> --merge --out1 <lecturas directas filtradas> --out2 <lecturas reversas filtradas> --merged_out <nombre de lecturas combinadas> --unpaired1 <nombre lecturas directas sin par> --unpaired2 <nombre lecturas reversas sin par> -y
```

Donde: --in[1,2] introduce el archivo de entrada de lecturas directas (1) y reversas (2), --out[1,2] introduce el archivo de salida de lecturas directas (1) y reversas (2), --merge combina cada par de lecturas complementarias (directas – reversas), --unpaired[1,2] guarda los archivos de lecturas directas (1) o reversas (2) sin emparejar porque sus complementarias no cumplen los controles de calidad, --merged out especifica el nombre de los archivos de salida resultantes de la combinación, e -y es un filtro de complejidad baja que elimina las colas poliA y poliG añadidas durante la secuenciación.

b. SPAdes

```
spades.py -1 <lecturas directas filtradas> -2 <lecturas reversas filtradas> --merged <lecturas combinadas> -s <lecturas sin par> --careful --threads 6 --memory 8 -o <directorio_salida>
```

Donde: [-1, -2] <nombre_archivo> introduce el archivo de entrada con lecturas directas (1) y reversas (2) filtradas, --merged <nombre_archivo> introduce el archivo con lecturas emparejadas fusionadas, -s <nombre_archivo> introduce el archivo con lecturas no emparejadas, --careful reduce el número de desajustes e indels cortos, --threads introduce el número de subprocesos, --memory establece el límite de memoria en Gb, y -o <directorio_salida> especifica el directorio de salida donde se guardan los archivos generados.

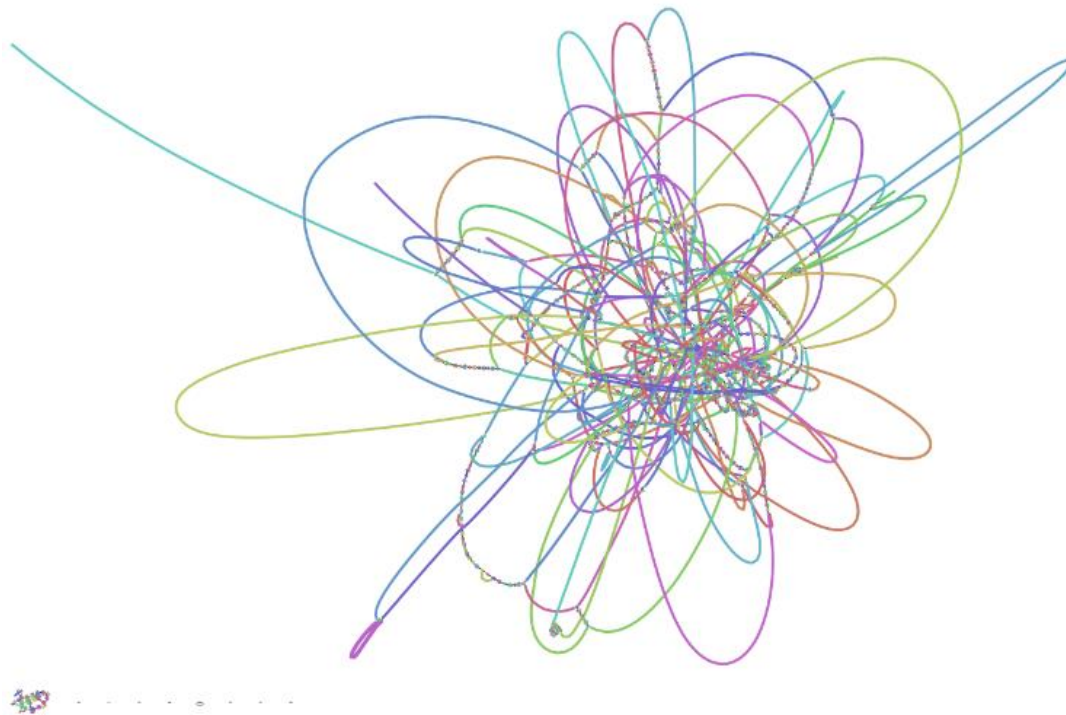
c. Bakta

```
bakta --min-contig-length 200 --output [I12/I16/I19]/bakta --genus [ ] --gram - --keep-contig-headers --threads 4 [I12/I16/I19 / spades_careful/scaffolds.fa]
```

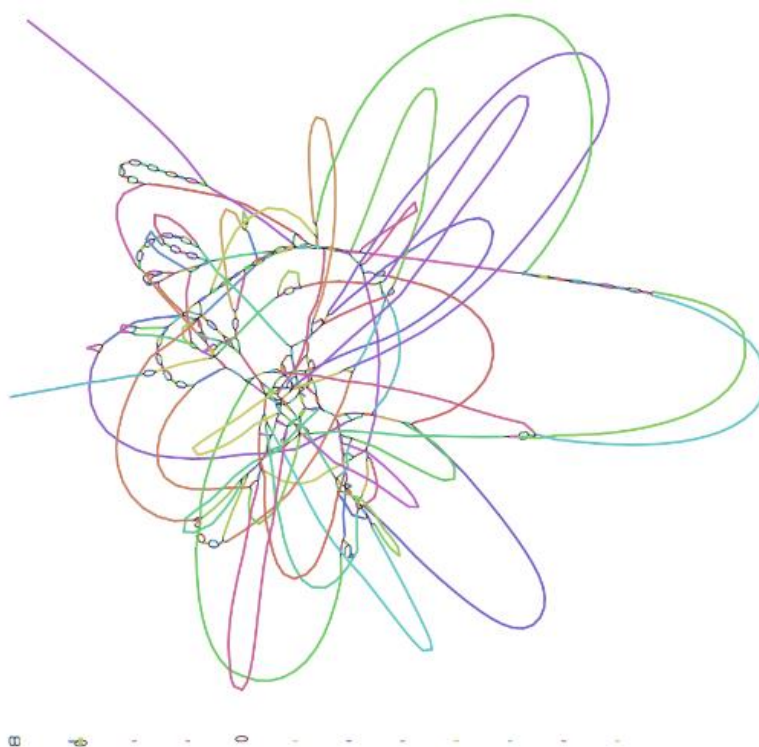
Donde: -- min-contig-length filtra por número mínimo de nucleótidos, --output <directorio_salida> especifica el directorio de salida donde se guardan los archivos resultantes, --genus introduce el género de la cepa en caso de conocerlo, --gram[+,-,?] especifica el tipo de bacteria para las predicciones del péptido señal, --keep-contig-headers mantiene los nombres originales de los contigs, --threads introduce el número de subprocesos, e [I12/I16/I19] / spades_careful/scaffolds.fa es el archivo de entrada de SPAdes en cada uno de los tres casos.

Anexo II: Visualización estructural de los genomas de I12, I16 e I19 por los gráficos Bandage y la base de datos Bakta

a. I12



b. I16



c. I19



d. Genes codificados en el plásmido NODE_15_length_141995_cov_75.177229

COMIENZO	FIN	GEN	PROTEÍNA
506	2431	sufI	Multicopper oxidase with three cupredoxin domains (includes cell division protein FtsP and spore coat protein CotA)
2498	3064	rpoE	DNA-directed RNA polymerase specialized sigma subunit, sigma24 family
3061	3501		Heavy metal resistance protein
3501	3773		Dihydroorotate dehydrogenase
3907	4284	copC	copper homeostasis periplasmic binding protein CopC
4289	5233	copD	copper homeostasis membrane protein CopD
5412	7985	cadA	Heavy metal-binding TRASH/YHS domain, putative Cu/Ag metallochaperone
7982	8380	cueR	Cu(I)-responsive transcriptional regulator
8407	9042	fixJ	DNA-binding response regulator, FixJ family, consists of REC and HTH domains
9605	10513	prs	Phosphoribosylpyrophosphate synthetase
10510	12048	deoA	Thymidine phosphorylase
12045	13493	ySH1	RNA processing exonuclease, beta-lactamase fold, Cft2 family
13746	14009		DUF2933 domain-containing protein
14006	14860	sTE14	Protein-S-isoprenylcysteine O-methyltransferase Ste14
14795	15364		HTH marR-type domain-containing protein
15586	16347	csgD	DNA-binding transcriptional regulator, CsgD family
16430	17107	csgD	DNA-binding transcriptional regulator, CsgD family
17182	17793	lasI	N-acyl-homoserine lactone synthase LasI (autoinducer biosynthesis)
17805	18737	phyH	Ectoine hydroxylase-related dioxygenase, phytanoyl-CoA dioxygenase (PhyH) family
18801	19139		DUF2845 domain-containing protein

19136	19801	virB1	Type IV secretion system protein VirB1
19798	20136		Type VI secretion protein
20133	20483	virB3	Type IV secretory pathway, VirB3 component
20476	22887	virB4	Type IV secretory pathway, VirB4 component
22891	23607		Type VI secretion protein
23831	24775	avhB6	Type IV secretion protein AvhB6
25116	25814	virB8	Type IV secretory pathway, component VirB8
25811	26668	virB9	P-type conjugative transfer protein VirB9
26672	27898	virB10	Type IV secretory pathway, VirB10 component
27902	28906	virB11	P-type DNA transfer ATPase VirB11
28890	30854	virD4	Type IV secretory pathway, VirD4 component, TraG/TraD family ATPase
30844	31713		DNA transfer TraO-like protein
31811	32008	copG	Ribbon-helix-helix protein CopG domain-containing protein
32008	33186	mazG	MazG C-terminal domain-containing protein
33183	33887		Uracil-DNA glycosylase
33854	34633		Thymidylate synthase
34605	35285		Cysteine protease, C1A family
35291	36301	iCP	Chagasin-like inhibitor of cysteine peptidase, I42 family
36304	36678		Xre-family transcriptional regulator
36675	37013		Carrier domain-containing protein
37189	37392		DUF551 domain-containing protein
37553	37828		hypothetical protein
38184	38600		(pseudo) Nucleotidyl transferase AbiEii/AbiGii toxin family protein
38593	39201		Transcriptional regulator, AbiEi antitoxin, Type IV TA system
39370	40491	virD2	Type IV secretory pathway, VirD2 component (relaxase)
40484	41044		Bacterial mobilisation domain-containing protein
41251	42198	spo0J	Chromosome segregation protein Spo0J, contains ParB-like nuclease domain
42198	42962	parA	ParA-like ATPase involved in chromosome/plasmid partitioning or cellulose biosynthesis protein BcsQ
42975	43151		Cbb3-type cytochrome oxidase subunit 3
43343	43735		DUF3768 domain-containing protein
44043	44234		hypothetical protein
44943	45185		hypothetical protein
45113	45277		hypothetical protein
45584	46018	yncB	Endonuclease YncB, thermonuclease family
46094	46501	ssb	Single-stranded DNA-binding protein
46909	47577		HEPN domain-containing protein
47690	48832		Chromosome segregation ATPase
48979	49662	arsH	arsenical resistance protein ArsH
49719	50150	arsN2	arsenic resistance N-acetyltransferase ArsN2
50147	51214	arsB	ACR3 family arsenite efflux transporter
51211	51651	arsC	arsenate reductase (glutaredoxin)
51648	52184	wzb	Protein-tyrosine-phosphatase
52197	52535	arsR	DNA-binding transcriptional regulator, ArsR family
52588	53511	ardC	Antirestriction protein ArdC
53604	55616	spo0J	Chromosome segregation protein Spo0J, contains ParB-like nuclease domain
55728	59927	trm11	tRNA G10 N-methylase Trm11

59994	60629		Toprim domain-containing protein
60922	61248	ssb	Single-stranded DNA-binding protein
61915	63003		Protein involved in initiation of plasmid replication
63199	64401	parA	ParA-like ATPase involved in chromosome/plasmid partitioning or cellulose biosynthesis protein BcsQ
64449	65462	spo0J	Chromosome segregation protein Spo0J, contains ParB-like nuclease domain
65527	65877		Antitoxin Xre/MbcA/ParS-like toxin-binding domain-containing protein
65922	66605		RES domain-containing protein
66605	67003		DUF2384 domain-containing protein
67100	68299		DUF2336 domain-containing protein
68413	69651		Integrase
69962	70168		hypothetical protein
70313	71614		Transporter
71617	72768	acrA	Multidrug efflux pump subunit AcrA (membrane-fusion protein)
72771	76007	cusA	Cu/Ag efflux pump CusA
76111	76608		SRPBCC domain-containing protein
76605	77213		RND transporter
77296	79797		ATPase
80043	80702		Cation efflux protein
80778	81182	merR	MerR family transcriptional regulator
81239	81874		Cation transporter
81871	82515	ubiE	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis C-methylase UbiE
82532	83074		MAPEG family protein
83060	85054		Cytochrome c domain-containing protein
85843	86181		Secreted protein
86313	86426	cusF	Copper binding protein CusF
86497	86904		Transcriptional regulator
86988	87356	merT	Mercuric transport protein MerT
87641	88030		Copper-binding protein
88027	91185		Cation transporter
91182	92666		Efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit
92663	93892		Transporter
94027	94299		hypothetical protein
94372	94671		hypothetical protein
95623	95907		Pentapeptide MXKDX repeat protein
95926	96144		hypothetical protein
96652	97011		hypothetical protein
97126	97482		hypothetical protein
97651	98103	soxR	DNA-binding transcriptional regulator, MerR family
98399	98743		Lipoprotein
98771	100693	fpr	Flavodoxin/ferredoxin--NADP reductase
100693	101421		Iron reductase
101418	102140		Cytochrome C
102127	102570		Uncharacterized membrane protein
102588	103025		Ferredoxin
103280	104581		DUF377 domain-containing protein
104810	105100		Pentapeptide MXKDX repeat protein

105419	105820		Pentapeptide MXKDX repeat protein
105968	106297		DUF5666 domain-containing protein
106550	108070	adhE	Acyl-CoA reductase or other NAD-dependent aldehyde dehydrogenase
108097	109122	adhP	alcohol dehydrogenase AdhP
109148	110854	sufI	Multicopper oxidase with three cupredoxin domains (includes cell division protein FtsP and spore coat protein CotA)
110851	111837	pcoB	Uncharacterized conserved protein involved in copper resistance
111834	113072		Major facilitator superfamily (MFS) profile domain-containing protein
113152	113589		DUF411 domain-containing protein
113973	114236	relB	Antitoxin component of the RelBE or YafQ-DinJ toxin-antitoxin module
114223	114504	yafQ	mRNA-degrading endonuclease YafQ (mRNA interferase), toxin component of the YafQ-DinJ toxin-antitoxin module
114788	114871		APC family permease
114984	115460		Transposase
115418	115600		Integrase
115587	116315	istB	IS21-like element helper ATPase IstB
116486	116944		TonB-dependent receptor-like beta-barrel domain-containing protein
117091	117831		GATA-type domain-containing protein
117654	119921	norB	Nitric oxide reductase large subunit
120000	120464	qdol	Cupin domain protein related to quercetin dioxygenase
120722	121180	iscR	DNA-binding transcriptional regulator, IscR family
121290	121727	yjbl	Truncated hemoglobin Yjbl
121720	121995	tehB	Tellurite resistance protein TehB, SAM-dependent methylase, cupin superfamily
122036	123247	hmpA	NO-inducible flavohemoprotein
123260	123721		Copper resistance protein D domain-containing protein
123971	124759		DUF306 domain-containing protein
125105	126748	ccoN	cytochrome-c oxidase, cbb3-type subunit I
126752	127504	ccoO	cytochrome-c oxidase, cbb3-type subunit II
127520	127690	ccoQ	Cbb3-type cytochrome oxidase, subunit 3
127681	128559	ccoP	cytochrome-c oxidase, cbb3-type subunit III
128556	128744		Transmembrane protein
128758	129576		Uncharacterized membrane protein
129579	131840	cadA	Cation-transporting P-type ATPase
131837	132046	ccoS	cbb3-type cytochrome oxidase assembly protein CcoS
132308	132586	csa3	CRISPR-associated protein Csa3, CARF domain
132945	133175		Integrase catalytic domain-containing protein
133794	134201	ssb	Single-stranded DNA-binding protein
134318	134863		Membrane protein
135071	135637	acrR	DNA-binding protein, AcrR family, includes nucleoid occlusion protein SlmA
135707	136537	yqjQ	SDR family oxidoreductase
136988	137956	corA	magnesium/cobalt transporter CorA
138016	138468	fixJ	DNA-binding response regulator, FixJ family, consists of REC and HTH domains
138505	139128	fixJ	DNA-binding response regulator, FixJ family, consists of REC and HTH domains
139118	140653		Signal transduction histidine kinase regulating C4-dicarboxylate transport system
140712	141185		DUF305 domain-containing protein
141276	141926		Copper resistance protein B

Anexo III: Ruta de degradación de clorociclohexano y clorobenceno representada por la base de datos KEGG

