



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
INSTITUTO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



MASTER UNIVERSITARIO
BIOTECNOLOGIA
TRABAJO FIN DE MASTER

**Aproximación metaproteómica para evaluar el
efecto de metales pesados en un diseño
experimental de microcosmos**

Marina Barbudo Lunar

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

TUTOR(a) Y Director(a): Carmen M^a Michán Doña

CODIRECTOR(A): José Alhama Carmona

Córdoba, 06/2020

Índice

Resumen.....	6
Abstract	7
1. Introducción	8
1.1. La contaminación ambiental: contaminación por metales.....	8
1.2. Contaminación por metales de los ecosistemas acuáticos.....	9
1.3. Evaluación de la contaminación: bioindicadores y biomarcadores	11
1.4. Los microorganismos como bioindicadores de contaminación: las aproximaciones metaómicas.....	12
1.5. Experimentos de campo vs experimentos de exposición: los microcosmos	14
2. Objetivos	16
3. Materiales y métodos	17
3.1. Diseño de los microcosmos.....	17
3.2. Extracción de microorganismos	18
3.3. Extracción de proteínas y su separación mediante electroforesis SDS-PAGE	19
3.4. Tinción y digitalización de geles	20
3.5. Análisis metaproteómico mediante espectrometría de masas	20
3.6. Análisis taxonómico y funcional.....	22
3.7. Análisis estadístico	22
4. Resultados	24
4.1. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas	24
4.2. Proteínas y procesos biológicos afectados por la exposición a la mezcla de metales.....	26
4.3. Análisis de clústeres	30
5. Discusión	33
6. Conclusiones.....	37
Bibliografía	38

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1. Diseño experimental del microcosmos expuesto a la mezcla de metales plata y cadmio..	18
Ilustración 2. Clasificación taxonómica a nivel de familia de las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas.....	25
Ilustración 3. Diagrama de Venn de las proteínas totales identificadas mediante espectrometría de masas.	28
Ilustración 4. Diagrama de Venn de las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas que mostraron cambios significativos.....	29
Ilustración 5. Clasificación de las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas según el proceso biológico en el que intervienen.....	30
Ilustración 6. Análisis de clústeres de las proteínas que muestran cambios significativos en su patrón de expresión.	31

Índice de Tablas

Tabla 1. Número de identificaciones de las familias de bacterias reconocidas tras la identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas25

Tabla 2. Proteínas de la población bacteriana que muestran cambios significativos entre las distintas condiciones ensayadas.26

Resumen

La contaminación es uno de los grandes problemas a los que se enfrenta la sociedad actual, que afecta al bienestar de los ecosistemas. Destacan los ecosistemas acuáticos por su relevancia económica y ecológica. La liberación de metales pesados en las aguas se ha potenciado como consecuencia de distintas actividades antropogénicas. Los cambios en la estructura y funcionalidad de las poblaciones microbianas se han propuesto como marcadores biológicos de respuesta a la contaminación ambiental. En este trabajo, se ha estudiado el efecto de la combinación de los metales plata y cadmio a distintas concentraciones (0, 5 y 50 µg/L) sobre el microbioma de sedimentos en un sistema de microcosmos acuático artificial. Si evaluamos la distribución de las familias a las que pertenecen las proteínas identificadas, la exposición aguda a la mezcla de metales dio lugar a una pérdida de la diversidad y a una disminución en el número de identificaciones en numerosas familias de microorganismos, destacando *Rhizobiaceae*, *Rhodobacteraceae* y *Rhodospirillaceae*. Además, la exposición a estos contaminantes supuso una alteración en el patrón de expresión de las proteínas identificadas. A la concentración más baja de la mezcla de metales se produjo un aumento en la diversidad y número de funciones, destacando los procesos biológicos de transporte y unión a metales, que podrían relacionarse con la activación de mecanismos de resistencia frente a estos contaminantes. No obstante, muchas funciones como la respuesta a estrés o la unión a metales desaparecieron a la mayor concentración de la mezcla, lo cual podría indicar que la capacidad de defensa de las bacterias se ve comprometida como consecuencia de la exposición aguda. El análisis de clústeres de las proteínas con cambios significativos en las distintas condiciones permitió distinguir 4 patrones diferentes. Estos cambios, asociados a las funciones biológicas de las proteínas identificadas, podrían emplearse como biomarcadores específicos de este tipo de contaminación. Los estudios metaproteómicos constituyen, por tanto, una buena aproximación para estudiar los efectos biológicos de los contaminantes y sus posibles consecuencias toxicológicas.

Palabras clave: cadmio; bacterias; contaminación ambiental; ecosistemas acuáticos; metales; metaproteómica; microcosmos; plata

Abstract

Pollution is one of the major problems faced by today's society, which affects the well-being of ecosystems. Aquatic ecosystems stand out for their economic and ecological relevance. The release of heavy metals into water bodies has been enhanced because of different anthropogenic activities. Changes in the structure and functionality of microbial populations have been proposed as biological markers of response to environmental pollution. In this study, the effect of the combination of heavy metals cadmium and silver, at different concentrations (0, 5 and 50 $\mu\text{g/L}$) on the microbiome of the artificial aquatic microcosms' sediments, has been investigated. If we evaluate the distribution of the microbial families whose proteins have been identified, the acute exposure to the mixture of metals led to a loss of diversity and a decrease in the number of identifications in numerous families of microorganisms, highlighting *Rhizobiaceae*, *Rhodobacteraceae* and *Rhodospirillaceae*. Furthermore, the exposure to these pollutants altered the expression patterns of the identified proteins. At the lowest concentration of the metal mixture, there was an increase in the diversity and number of functions, highlighting biological processes as transport and metal-binding, which could be related to the activation of resistance mechanisms against metals. However, many functions such as stress response or metal-binding, disappeared at the acute concentration of the mixture, which could indicate that the defence capacity of bacteria is compromised due to this exposure. Cluster analysis of proteins with significant changes under the different conditions allowed us to distinguish 4 different patterns. These changes, associated with the biological functions of the identified proteins, could be used as specific biomarkers of this type of pollution. Metaproteomics studies are, therefore, a good approach to study the biological effects of pollutants and their possible toxicological consequences.

Key words: aquatic ecosystems; bacteria; cadmium; environmental pollution; metals; metaproteomics; microcosms; silver

1. Introducción

1.1. La contaminación ambiental: contaminación por metales

La contaminación es uno de los grandes problemas a los que se enfrenta la sociedad actual, ya que pone en jaque la sostenibilidad de los ecosistemas, afectando al estado de la atmósfera, la litosfera, la hidrosfera y la biosfera (Ibañez et al., 2007). La contaminación se puede definir como la introducción de sustancias que provocan un efecto deletéreo sobre las distintas esferas del medio ambiente (Rahman & Singh, 2019). La introducción de estos contaminantes puede tener distintos orígenes, desde procesos naturales, como las erupciones volcánicas o la meteorización de las rocas, hasta procesos antropogénicos (Masindi & Muedi, 2018) o por residuos de origen animal y/o vegetal fermentados o con capacidad de fermentar (por ejemplo: los purines). El creciente desarrollo de ciertas actividades antropogénicas, como la minería, la industria o la urbanización, ha desembocado en la liberación de gran cantidad de sustancias contaminantes al medio ambiente (Masindi & Muedi, 2018). Además, el incremento de la población mundial aumenta la cantidad de residuos producida por el ser humano y, por tanto, la presión ejercida sobre los ecosistemas, comprometiendo la integridad de estos y, por ende, la salud de los seres vivos que los habitan (Mittal, 2013).

Los contaminantes pueden ser sustancias que se encuentran en el ecosistema y son producidas naturalmente o sustancias totalmente ajenas a los mismos, que se denominan xenobióticos. En el primer caso, estas sustancias resultan tóxicas cuando están presentes en concentraciones mucho más altas de lo habitual. Existen distintos tipos de sustancias contaminantes, las cuales pueden clasificarse como contaminantes orgánicos, inorgánicos y biológicos (Masindi & Muedi, 2018). Entre los contaminantes inorgánicos es de especial interés el estudio de la contaminación por metales pesados. Estos se caracterizan por ser elementos con un elevado peso atómico y una alta densidad, siendo esta por lo menos 5 veces mayor que la del agua. Muchos de estos metales son considerados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Rai, 2008).

Algunos metales pesados como arsénico, plomo, mercurio, cadmio o plata aparecen recogidos en la lista de principales contaminantes elaborada en 2019 por la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) ("Substance Priority List" | ATSDR, 2021). Dicha lista engloba a aquellos contaminantes que, por su frecuencia y toxicidad, suponen un riesgo considerable para el ser humano.

La exposición de la población a metales pesados puede desembocar en desórdenes neurológicos y del comportamiento, como fatiga, insomnio, depresión, enfermedades intestinales, irritabilidad o una disminución de la concentración, así como en disfunción renal o enfermedades óseas (Rai, 2008). Además, los metales pueden acumularse en el cuerpo de los seres vivos a través de la cadena alimenticia, lo cual puede provocar daño en el ADN y dar lugar a efectos carcinogénicos como consecuencia de su capacidad mutagénica. Metales como el cadmio, el cromo y el cobre han sido relacionados con varios tipos de cáncer y con dermatitis (Rai, 2008).

1.2. Contaminación por metales de los ecosistemas acuáticos

De especial interés es la contaminación de las aguas por metales pesados debido a su toxicidad, abundancia y persistencia, así como por la relevancia de estos ecosistemas en sí, ya que constituyen una fuente de alimento y son de gran importancia en distintos ámbitos como el transporte, el ocio, la agricultura o la industria (Häder et al., 2020).

Dentro de los ecosistemas acuáticos, la contaminación por metales pesados es más frecuente en las zonas costeras y en los estuarios que en los océanos (Rai, 2008). Además, los ríos y lagos pueden verse muy afectados por este tipo de contaminación en función del caudal y de la proximidad del cuerpo acuoso con el origen de dichos metales. La influencia de los seres humanos se pone de manifiesto en los altos niveles de cadmio, cromo, plomo, mercurio y cinc que se encuentran en estos cursos de agua (Rai, 2008).

La introducción de metales en los ecosistemas acuáticos se debe a varios factores, distinguiendo entre procesos naturales y actividades antropogénicas. En los últimos años, los ecosistemas acuáticos se han visto sometidos a la presión antropogénica derivada de actividades como la agricultura, la urbanización, la gestión de los residuos urbanos, la minería, la industria y, en general, debido al rápido crecimiento de la población global (Islam et al., 2015). A esto hay que añadir que los ecosistemas acuáticos son muy propensos a la contaminación debido al empleo del agua en la industria y a la liberación directa de contaminantes a los cursos del agua.

El 41,3% de las masas de agua superficiales españolas (ríos, lagos y costas) no cumple los requisitos marcados por la normativa de aguas, ya sea por la sobreexplotación a la que se ven sometidas o a la contaminación (“Informe de seguimiento de Planes Hidrológicos y Recursos

Hídricos en España” | Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, 2020). Entre los contaminantes de las aguas españolas encontramos a los metales pesados. Un claro ejemplo es el estudio desarrollado por Alonso Castillo y sus colaboradores sobre la calidad de las aguas de la costa de Málaga (España), con el objeto de analizar la presencia de metales pesados y su distribución. Se detectaron altos niveles de níquel, cadmio y plomo, entre otros. La presencia de metales en estas aguas deriva principalmente del turismo masivo, las actividades industriales, la urbanización y el tratamiento de las aguas residuales (Alonso Castillo et al., 2013). A pesar de que los metales suelen encontrarse a bajas concentraciones en las aguas, muchos de ellos son tóxicos incluso a estas bajas concentraciones, como es el caso del arsénico, plomo, cadmio, níquel, mercurio, cromo, cobalto, cinc y selenio (Masindi & Muedi, 2018).

Los ecosistemas acuáticos, con un elevado nivel de contaminación, pierden parte o la totalidad de su fauna y flora, comprometiendo la biodiversidad y dando lugar a la desaparición de especies (Rai, 2008). Con el fin de proteger la vida acuática y asegurar el correcto funcionamiento de los ecosistemas, es necesario identificar las principales sustancias contaminantes, su origen y el impacto que pueden ocasionar en dichos ecosistemas. Además, la combinación de metales pesados puede dar lugar a efectos totalmente distintos a los que tienen estos contaminantes por separado, originando efectos aditivos, sinérgicos, antagónicos o potenciadores impredecibles, por lo que es de especial interés el estudio del impacto de dicha combinación sobre los ecosistemas (Rodea-Palomares et al., 2015), y su efecto biológico sobre los organismos que los habitan. Todos estos estudios permitirán desarrollar medidas más prácticas a la hora de minimizar los daños ocasionados a las formas de vida acuáticas (Amoatey & Baawain, 2019).

Existen diversas tecnologías que permiten remediar la contaminación por metales, ya sea mediante métodos químicos, físicos o biológicos. No obstante, existe demanda de nuevas aproximaciones que permitan la detección temprana de los efectos biológicos de los contaminantes para poder actuar en consecuencia, con eficacia y rapidez (Lionetto et al., 2019).

1.3. Evaluación de la contaminación: bioindicadores y biomarcadores

Para la detección de los contaminantes es posible emplear organismos bioindicadores que permitan detectar pequeñas concentraciones de esas sustancias tóxicas y evaluar sus efectos biológicos. Un organismo bioindicador o centinela es una especie o grupo de especies que permite evaluar el estado de un ecosistema, así como los cambios que se producen con el tiempo (Holt & Miller, 2010).

Los organismos bioindicadores responden a la presencia de contaminantes adaptando su metabolismo y estructura. De esta forma, midiendo dichas respuestas, podemos monitorizar el estado de los ecosistemas. Los cambios en las respuestas biológicas de los organismos bioindicadores ante la exposición a contaminantes reciben el nombre de biomarcadores (Holt & Miller, 2010). Los biomarcadores de contaminación son alteraciones en las respuestas biológicas que ocurren a nivel molecular, celular o fisiológico y que están provocadas por la exposición a las sustancias contaminantes (Lionetto et al., 2019). Su estudio permite comparar una situación control con la exposición a sustancias tóxicas. Los biomarcadores moleculares y celulares permiten detectar de forma temprana bajas concentraciones de contaminantes, por lo cual son de gran interés a la hora de realizar controles preventivos sobre la calidad de las aguas, alertando sobre una posible alteración de la salud de las distintas formas de vida antes de que los daños sean irreparables (Lionetto et al., 2019).

Se han estudiado un número considerable de biomarcadores en una serie de organismos bioindicadores concretos, siendo de gran interés los invertebrados. Los moluscos bivalvos y los crustáceos suelen emplearse como organismos centinelas a la hora de monitorizar el estado de los ecosistemas acuáticos debido a su amplia distribución, su tolerancia relativa a los contaminantes y a su estilo de vida sedentario (en el caso de los moluscos). El uso de organismos invertebrados como centinelas también es de interés en los ecosistemas terrestres ya que se encuentran en contacto directo con el suelo (Lionetto et al., 2019). Las respuestas bioquímicas y celulares que estos organismos ponen en marcha tras la exposición a contaminantes permiten el estudio de los niveles de contaminación de los ecosistemas en los que están presentes. Sin embargo, los organismos centinela no se limitan a los invertebrados, sino que podemos emplear otras formas de vida como algas (Mu et al., 2018) o microorganismos (Fierros-Romero et al., 2020).

1.4. Los microorganismos como bioindicadores de contaminación: las aproximaciones metaómicas

El empleo de microorganismos como organismos bioindicadores tiene un gran potencial debido a que estos organismos se encuentran directamente expuestos a los contaminantes, lo cual facilita la rápida detección de cambios leves en el ecosistema. Algunas de las ventajas del uso de microorganismos como centinelas son: su alta sensibilidad a contaminantes, su alta capacidad de interacción con los mismos, su amplia distribución en todos los ecosistemas, la menor variabilidad intraclase de los microorganismos y la falta de restricciones éticas para trabajar con ellos (Michán et al., 2021). Dentro de los ecosistemas acuáticos, los microorganismos pueden localizarse tanto en las aguas como en los sedimentos (Siggins et al., 2012). De hecho, los sedimentos son el principal depósito de metales pesados en los ecosistemas acuáticos (Rahman & Singh, 2019), lo cual asegura la interacción entre microorganismos localizados en ellos y los metales, pudiendo emplearse estos microorganismos como centinelas de contaminación por dichos metales.

Debido a que la mayor parte de los microorganismos presentes en el medio ambiente no se han conseguido cultivar, su investigación requiere del uso de técnicas moleculares que sustituyan el aislamiento y el cultivo de especies individuales. Además, el estudio de las comunidades microbianas en su hábitat natural es la clave para comprender su papel en la naturaleza (Siggins et al., 2011).

Hoy en día existen técnicas que estudian los distintos niveles de información biológica (ADN, ARN, proteínas y metabolitos), aportando información sobre las interacciones funcionales microbianas que tienen lugar en un ecosistema concreto. Estas técnicas, conocidas como “metaómicas”, permiten estudiar las comunidades microbianas como un único metaorganismo (Siggins et al., 2011), es decir, permiten realizar un análisis masivo sobre la totalidad de la comunidad. La metagenómica, la metatranscriptómica, la metaproteómica y la metametabolómica permiten el estudio del ADN, ARN, proteínas y metabolitos, respectivamente (Siggins et al., 2012).

La metaproteómica es la ómica que permite identificar las proteínas expresadas en un momento concreto del tiempo en un ecosistema, aportando información sobre la funcionalidad de la comunidad microbiana (Hettich et al., 2012). Esta técnica se ha aplicado en diversos ecosistemas, tales como: suelos, sedimentos, aguas o incluso el tracto digestivo

humano (Siggins et al., 2012). Este tipo de análisis es especialmente relevante cuando disponemos de datos metagenómicos, ya que esto permite la identificación de las proteínas de una muestra al comparar con la información recogida en las bases de datos (Siggins et al., 2011), lo que permite estudiar la organización y las actividades funcionales y metabólicas de estos seres vivos (Hettich et al., 2012).

La metaproteómica presenta una serie de ventajas con respecto a otras ómicas. La metagenómica únicamente aporta información acerca del potencial funcional de una población microbiana, pero no nos informa sobre la actividad real de dichos microorganismos. Por otra parte, la metatranscriptómica no tiene en cuenta los efectos ejercidos por la regulación traduccional. La metaproteómica supone la mejor aproximación al estudio de la funcionalidad microbiana, permitiendo estudiar qué proteínas se expresan, qué rutas metabólicas se alteran, y en qué condiciones (Siggins et al., 2011).

Los microorganismos desempeñan un papel fundamental en los ciclos de nutrientes y en la degradación de desechos de origen natural y antropogénico, siendo muchas de estas reacciones catalizadas por enzimas microbianas (Wilmes & Bond, 2006). Además, en respuesta a sustancias contaminantes, los microorganismos pueden sufrir adaptaciones estructurales y metabólicas que les permitan sobrevivir (Michán et al., 2021). Estos mecanismos de adaptación se basan en la regulación de la expresión de genes de resistencia a distintos tipos de estrés (Michán et al., 2021).

Por tanto, el estudio de las proteínas de microorganismos de los distintos ecosistemas permitiría conocer qué mecanismos biológicos se ponen en marcha bajo condiciones ambientales específicas (Hettich et al., 2012), como podría ser la exposición a metales pesados, con respecto a una situación control. El objetivo de la metaproteómica es la caracterización de la expresión funcional del metagenoma y deducir así las rutas metabólicas, incluyendo los sistemas de defensa frente a la exposición a distintos tipos de estrés, que responden a los contaminantes (Hettich et al., 2012). La identificación de las proteínas se realiza por espectrometría de masas, una técnica analítica que permite identificar, caracterizar y cuantificar proteínas de muestras complejas y con una elevada sensibilidad (Domon & Aebersold, 2006).

A pesar de todo, la metaproteómica tiene sus limitaciones a la hora de tomar las muestras, extraer e identificar las proteínas y analizar los resultados obtenidos. Uno de los problemas

principales a la hora de emplear estas técnicas es la toma y conservación. En la mayoría de las muestras ambientales, la densidad microbiana es muy baja y la mayor parte de los microorganismos presentes en los distintos ecosistemas no pueden cultivarse. Además, la información obtenida tras el estudio del proteoma únicamente refleja los datos correspondientes con los organismos más abundantes en las muestras, sin tener en cuenta aquellas especies más escasas o dispersas (Wang et al., 2016). Otra limitación crucial para tener en cuenta es la extracción de las proteínas desde muestras complejas, ya que se tratan de mezclas de numerosos compuestos orgánicos e inorgánicos. No existe un protocolo universal que permita extraer las proteínas de muestras ambientales debido a la distribución heterogénea de las especies, las diferencias en los niveles de abundancia entre distintas proteínas y la existencia de gran cantidad de sustancias interferentes (Wang et al., 2016).

Por otra parte, la identificación de las proteínas depende, en gran medida, del diseño y la calidad de las bases de datos. Además, el nivel de confianza con el que las proteínas se asocian a los taxones está limitado por el número de especies presentes en las bases de datos, por lo que una asociación funcional suele ser más fiable que una asociación taxonómica (Wang et al., 2016). La mejora de los protocolos de extracción y la construcción de bases de datos con una mayor cantidad de información son aspectos claves para realizar estudios que se ajusten mejor a la realidad, pudiendo permitir estudiar los cambios que sufren las comunidades microbianas ante la exposición a contaminantes (Wang et al., 2016).

1.5. Experimentos de campo vs experimentos de exposición: los microcosmos

Los microcosmos son sistemas multiespecie de pequeño tamaño que comparten las propiedades bióticas y abióticas de un ecosistema de mayor tamaño, imitando las cadenas tróficas, los ciclos de producción-consumo y la jerarquía propia del ecosistema de interés (Matheson, 2008). Por ello, un microcosmo es un modelo simplificado de un ecosistema que permite realizar experimentos controlados tanto en laboratorios como *in situ*, por lo que son de gran interés en ecología terrestre y acuática. Además, al tratarse de sistemas multiespecie, los microcosmos nos permiten estudiar con mayor precisión las interacciones que tienen lugar en el ecosistema, y que implican tanto a seres vivos de distintos niveles tróficos como a sustancias. Estos sistemas pueden estar aislados total o parcialmente del mundo exterior mediante el empleo de contenedores.

Hoy en día, los microcosmos acuáticos son ampliamente usados en el estudio del destino y los efectos de contaminantes (Matheson, 2008) bajo condiciones controladas, simulando la realidad del ecosistema. Un microcosmos acuático consta de una masa de agua y de una capa de sedimento, de forma que las dimensiones del tanque empleado se eligen de acuerdo con el objetivo del estudio a realizar (Traub-Eberhard et al., 1993).

Los experimentos basados en el empleo de microcosmos suelen acompañarse de modelos matemáticos teóricos, así como de experimentos de campo, los cuales aportan información adicional a la hora de llevar a cabo una investigación de gran envergadura que incluya a los ecosistemas reales (Matheson, 2008).

A pesar del alto coste, el tiempo requerido, la complejidad y la variabilidad que supone el empleo de estos sistemas, el diseño y el uso de microcosmos es de gran utilidad ya que podemos llevar a cabo estudios toxicológicos sin comprometer la integridad del ecosistema real, además de estar más próximos a la estructura real de los ecosistemas que los experimentos de exposición de una sola especie, al permitir estudiar el impacto de las sustancias de interés sobre la totalidad de las formas de vida que se encuentran en un ecosistema (Matheson, 2008). Además, con estos sistemas tenemos la ventaja de ejercer un mayor control de las variables fisicoquímicas, así como una mayor reproducibilidad de los experimentos, lo cual no ocurre en el caso de los estudios de campo. Esto facilita la identificación de relaciones causa-efecto entre contaminantes y seres vivos, y aporta más información sobre dichas relaciones (Matheson, 2008).

En definitiva, el diseño de microcosmos artificiales nos permite realizar experimentos de exposición a contaminantes y estudiar las alteraciones biológicas, como cambios en el proteoma, que tengan lugar en las poblaciones de microorganismos como consecuencia de estas exposiciones. Estos cambios biológicos funcionarán como biomarcadores de contaminación, alertando de la presencia de sustancias tóxicas, como metales pesados, y permitiendo poner en marcha protocolos de acción que permitan minimizar el impacto nocivo de dichas sustancias sobre las distintas formas de vida.

2. Objetivos

La finalidad de este estudio es la búsqueda de biomarcadores de contaminación ambiental que permitan monitorizar los niveles de sustancias tóxicas presentes en ecosistemas acuáticos, así como el análisis de las respuestas biológicas de los microorganismos tras la exposición a los contaminantes.

Siendo más concretos, el objetivo de este trabajo es el estudio de los cambios que se producen en el proteoma del microbioma de sedimentos tras la exposición a una combinación de dos metales pesados, plata y cadmio, en un ecosistema acuático artificial de microcosmos. Se trata de evaluar qué rutas metabólicas y procesos celulares se ven afectados por los contaminantes, y las respuestas de defensa que desarrollan los microorganismos frente a la contaminación por metales. Para ello, se ha seguido una aproximación metaproteómica que implica la extracción de proteínas directamente desde muestras de sedimentos, y su identificación y cuantificación mediante la aplicación de la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) y búsqueda en bases de datos.

3. Materiales y métodos

3.1. Diseño de los microcosmos

Para estudiar las respuestas del microbioma a la exposición conjunta a plata y cadmio se utilizó un diseño de microcosmos artificial (Ilustración 1). La exposición a dichos metales se llevó a cabo en tanques experimentales bajo condiciones controladas de temperatura, oxígeno disuelto, fotoperiodo y pH. Este experimento se realizó en el Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN-CSIC), un centro que cuenta con las instalaciones, el equipo y el personal adecuados para llevar a cabo este tipo de estudios. Los microcosmos contenían los microorganismos presentes en las aguas y en los sedimentos, que provenían de las inmediaciones del centro, así como diversos organismos acuáticos modelo: la coquina de fango *Scrobicularia plana*, dos especies de microalgas (*Nannochloropsis gaditana* y *Phaeodactylum tricornutum*) y un crustáceo (*Artemia sp.*). En este trabajo se estudiaron los microorganismos bacterianos presentes en los sedimentos.

El tratamiento de exposición a los metales pesados plata y cadmio (Ag-Cd) se realizó empleando dos concentraciones distintas de metales: una concentración baja de 5 µg/L, equivalente a una dosis fisiológicamente relevante, y una concentración 10 veces mayor (50 µg/L), equivalente a una exposición aguda de estos metales. También se preparó un control sin exponer a los metales. Las muestras para analizar fueron tomadas 7 días después del inicio de la exposición.

Para cada condición estudiada (0, 5 y 50 µg/L) se realizaron tres réplicas biológicas. Por ello, el experimento de exposición se realizó en un tanque compuesto por 9 cilindros: 3 cilindros para el control, 3 cilindros para la exposición leve de 5 µg/L y 3 cilindros para la concentración aguda de 50 µg/L. Cada cilindro contenía una capa de sedimento de 20 cm en el fondo, y una columna de agua de 80 cm por encima de dicho sedimento (Ilustración 1).

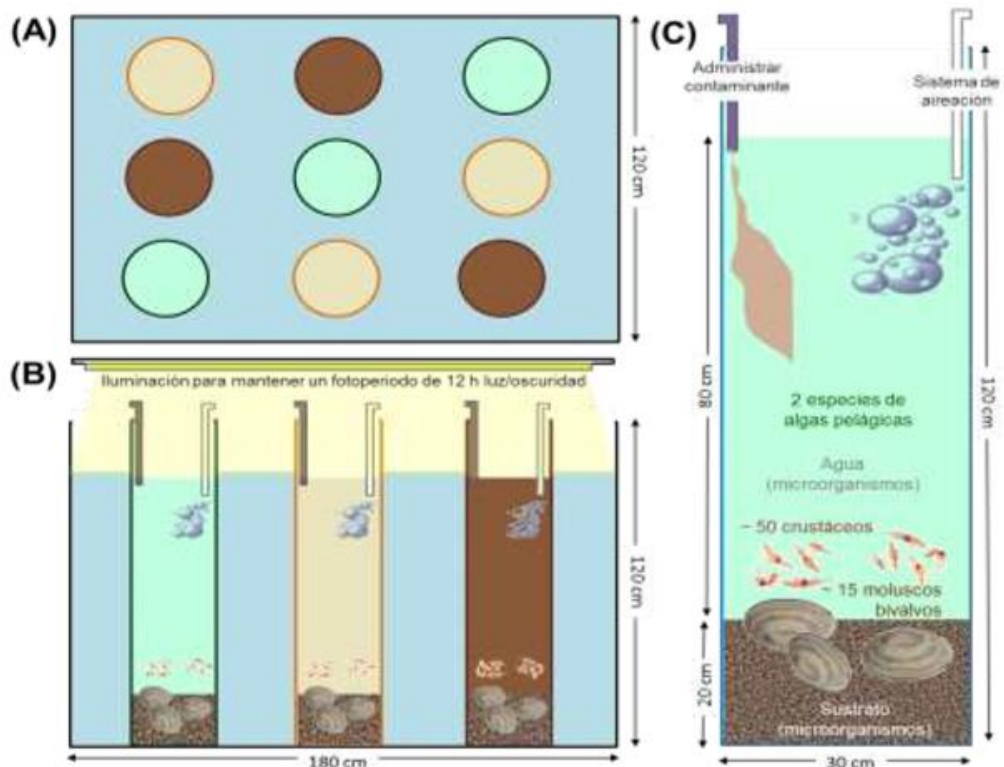


Ilustración 1. Diseño experimental del microcosmos expuesto a la mezcla de metales plata y cadmio. En (A) se muestra un corte transversal y en (B) un corte lateral de los tanques artificiales donde se realizó la exposición. En (C) se muestra cómo son los cilindros situados en el tanque, así como sus medidas. Cilindros control (●), cilindros con una exposición baja de 5 $\mu\text{g/L}$ (●), y cilindros con una exposición aguda de 50 $\mu\text{g/L}$ (●) de contaminante.

3.2. Extracción de microorganismos

Las muestras de sedimento se centrifugaron (centrífuga Avanti 30, Beckman) a 15.000 rpm durante 5 minutos con el fin de eliminar el exceso de agua. Se pesaron por duplicado tres réplicas de 500 mg por cada condición: control sin exponer (C1, C2 y C3), concentración de 5 $\mu\text{g/L}$ de la mezcla de metales (5Ag-Cd1, 5Ag-Cd2 y 5Ag-Cd3) y concentración de 50 $\mu\text{g/L}$ de la mezcla de metales (50Ag-Cd1, 50Ag-Cd2 y 50Ag-Cd3).

Las muestras se trataron con una solución alcalina NaOH 0,5 M en una proporción 3:1 y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, realizando una suave agitación cada 5 minutos. El tratamiento con NaOH permite la separación de los microorganismos de la mayor parte del material particulado, incluidas las sustancias interferentes (ácidos húmicos, arcillas, etc.).

Tras este tratamiento, las muestras se centrifugaron a 500 g (1 minuto, 20°C). Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes en tubos limpios y se dio un pulso de ultrasonidos (Ultrasons, Selecta) de 1 minuto. Las muestras se volvieron a centrifugar durante 1 min a 500 g (20°C), y se volvieron a recoger los sobrenadantes. A continuación, se centrifugaron a 25.000 g durante 10 minutos a 20°C, y se desecharon los sobrenadantes.

Posteriormente, se lavaron las pellas de microorganismos con 1,5 mL de TrisHCl 50 mM pH 7,5, añadiendo 10% glicerol 5 veces consecutivas, centrifugando 10 minutos a 25.000 g a temperatura ambiente entre los lavados. Además, en el segundo y tercer lavado se aplicó un pulso de 1 minuto de ultrasonidos. Finalmente, se centrifugó 10 minutos a 25.000 g y se retiró el sobrenadante.

3.3. Extracción de proteínas y su separación mediante electroforesis SDS-PAGE

Una vez separadas y lavadas las células bacterianas de las distintas muestras, se extrajeron las proteínas, que se separaron mediante electroforesis desnaturizante SDS-PAGE empleando un sistema mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad). Para ello, las muestras se resuspendieron en 15 µL de Tampón de Extracción 1x (Laemmli SDS sample buffer, reducing (4x) ThermoFisher; diluido con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5). La rotura de las células microbianas se realizó calentando las muestras durante 5 minutos a 95°C, y dando un pulso de 1 minuto de ultrasonidos antes y después del calentamiento. Las muestras se centrifugaron en la microfuga (Centrífuga 5415R, Eppendorf) a máxima velocidad durante 1 minuto. En este punto, se juntó el contenido de los dos tubos correspondientes a la misma réplica y se procedió a la realización de una electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Se cargaron 30 µL de cada muestra en un gel SDS-PAGE (1 mm de espesor; gel concentrador al 4% y gel separador al 8%), y como referencia se cargaron 2 µL de marcadores de masa molecular (Unstained Protein Molecular Weight Marker ThermoFisher, 14,4-116 kDa). Una vez cargadas las muestras, la electroforesis se desarrolló a 200 V y se dejó correr hasta que las muestras entraron 1 cm en el gel separador. Posteriormente se llevó a cabo la tinción para la visualización de las proteínas.

3.4. Tinción y digitalización de geles

Tras la electroforesis, el gel se tiñó con Coomassie Blue R-250 (solución para teñir geles: 0,25 g Coomassie Blue, solución decolorante (50% metanol, 3% acético)) y se mantuvo en agitación durante 1 hora aproximadamente. Tras desteñir el exceso de colorante (solución decolorante: 50% etanol, 3% acético), las imágenes de los geles se obtuvieron empleando el sistema ChemiDoc MP System y el software de captura de imagen Image Lab 4.1 (ambos de Bio-Rad).

3.5. Análisis metaproteómico mediante espectrometría de masas

Las muestras fueron enviadas al servicio de Proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI), de la Universidad de Córdoba. Para ello, a partir del gel de electroforesis se recortaron las bandas correspondientes a las proteínas, que se conservaron a 4°C en ácido acético al 1% hasta su análisis. Para la digestión proteica, las bandas de gel se lavaron con una solución de 200 mM de bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) y 50% de acetonitrilo durante 15 minutos, seguido de 5 minutos en solución de acetonitrilo al 100%. Las proteínas fueron reducidas empleando una solución 20 mM de DTT en 25 mM de NH_4HCO_3 , y se incubaron a 55°C durante 20 minutos, dejándose enfriar después hasta alcanzar la temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó la alquilación de los tioles reducidos mediante el uso de iodoacetamida 40 mM en 25 mM de NH_4HCO_3 , se incubó en oscuridad durante 20 minutos y se realizaron dos lavados del gel en NH_4HCO_3 25 mM. La digestión de las proteínas se realizó con tripsina (Promega, Madison, WI) con una concentración de 12,5 ng/ μL de enzima en 25 mM de NH_4HCO_3 , incubando a 37°C durante toda la noche. Finalmente, la digestión se detuvo añadiendo una solución de trifluoroacético al 1%.

Posteriormente, se realizó una nano-cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (nLC-MS/MS). La nano-cromatografía se llevó a cabo empleando un sistema Dionex Ultimate 3000 nano UPLC (Thermo Scientific) con una columna C18 75 μm x 50 mm Acclaim Pepmam (Thermo Scientific). Previamente a esto, la mezcla de péptidos a estudiar se pasó por una precolumna 300 μm x 5 mm Acclaim Pepmam (Thermo Scientific) en una solución de acetonitrilo 2% y TFA al 0,05%, con un flujo de 5 μL /minuto y a una temperatura de 40°C durante 5 minutos. Los tampones empleados como fases móviles fueron: tampón A compuesto por agua y ácido fórmico 0,1% y tampón B compuesto por acetonitrilo 20% y ácido fórmico 0,1%. Las muestras se separaron empleando un flujo de 300 nL/minuto. La elución,

de una duración total de 150 minutos, se realizó bajo las siguientes condiciones: 4-35% de tampón B durante 120 minutos, 35-55% de tampón B durante 6 minutos, 55-90% de tampón B durante 3 minutos, lavado con 90% de tampón B durante 8 minutos y re-equilibrado con 4% de tampón B durante 15 minutos.

El eluyente, el cual contenía los cationes peptídicos, fue convertido en iones en fase gaseosa mediante un sistema de ionización por nano-electro pulverización y se analizaron en un espectrómetro de masas Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT de Thermo Scientific) funcionando en modo positivo. El barrido de los péptidos precursores (desde 400 a 1500 m/z) se desarrolló con una resolución de 120K (a 200 m/z) con un objetivo de conteo de 4×10^5 iones.

La espectrometría de masas en tándem fue desarrollada mediante el aislamiento de 1,2 Da con el cuadrupolo, fragmentación CID (Disociación inducida por colisión) con una energía de colisión normalizada de 35 y un análisis de barrido de espectrometría de masas (MS) en la trampa iónica. La fragmentación CID es la forma de fragmentación más empleada en el análisis de péptidos (Zhu et al., 2017). Esta técnica de espectrometría de masas induce la fragmentación de los péptidos protonados, de forma que estos iones son acelerados aplicando un potencial eléctrico para incrementar la energía cinética, lo que permite que colisionen con moléculas gaseosas neutras, como el helio, en el primer espectrómetro. En la colisión, parte de la energía cinética se convierte en energía interna, la cual permite la rotura de enlaces y la fragmentación de los iones. A continuación, estos iones pueden analizarse mediante el segundo espectrómetro de masas (Dudley & Bond, 2014).

La población de iones diana se fijó en 2×10^3 y el tiempo máximo de inyección fue de 30 ms. Únicamente los precursores con una carga entre 2 y 5 fueron seleccionados para la realización de espectrometría de masas en tándem (MS²). La duración de la exclusión dinámica fue de 15 segundos con una tolerancia de 10 ppm en torno al precursor seleccionado y sus isótopos. El precursor monoisotópico seleccionado fue excitado. El aparato se programó para funcionar en ciclos de 3 segundos hasta un máximo de 30, es decir, el instrumento podía realizar eventos de MS² de forma continua hasta un máximo de 30 precursores no-excluidos o 3 segundos, lo que tuviera lugar antes.

Para el análisis de datos se empleó el software Proteome Discoverer 2.1.0.81 (Thermo Scientific). Los espectros de la espectrometría en tándem fueron buscados a partir del motor

de búsqueda SEQUEST contra la base datos de Uniprot-allspecies-Feb2017 (www.uniprot.org). Los péptidos se generaron mediante una digestión con tripsina teórica permitiendo un desapareamiento, e indicando como modificación fija la carbamidometilación de cisteínas y como modificación variable la oxidación de metionina. La tolerancia en la masa del péptido precursor fue de 10 ppm, y en los iones producto de 0,1 Da. Las coincidencias con los espectros peptídicos (“Peptide Spectral Matches”, PSM) se validaron empleando un filtro basado en q-values con un 1% de FDR (“False Discovery Rate”). FDR es la ratio entre los PSM falsos positivos y el número total de PSM que están por encima del score umbral, de manera que nos permite controlar los falsos positivos que se encuentran entre las verdaderas coincidencias con los espectros peptídicos. Esto es de interés ya que el avance de las técnicas proteómicas genera una gran cantidad de datos que necesitan ser procesados y controlados estadísticamente antes de estudiar el significado biológico de los resultados obtenidos (Aggarwal & Yadav, 2016). Finalmente, se empleó el software Proteome Discoverer para asignar proteínas a los péptidos identificados.

3.6. Análisis taxonómico y funcional

Tanto el análisis taxonómico para la identificación de las familias microbianas a las que pertenecen las proteínas como el análisis funcional para identificar el proceso biológico en el que intervienen dichas proteínas se han llevado a cabo empleando el paquete UniprotR de R desarrollado por Mohamed Soudy y Ali Mostafa. UniprotR permite visualizar información relativa a las proteínas registradas en la base de datos UniProtKB empleando el lenguaje de programación R (Soudy et al., 2020). Al introducir los códigos de Uniprot de las proteínas de interés, los comandos “*GetTaxonomic_lineage()*” y “*GetProteinGOInfo()*” nos permiten generar una tabla de datos taxonómicos y funcionales respectivamente.

3.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos resultantes de la espectrometría de masas se realizó mediante el programa Graphpad Prism 8.0.2. Para ello, se llevó a cabo un filtrado de los datos que asegurase un mínimo de concordancia entre las réplicas de cada condición, eliminando los que no tenían datos de intensidad en al menos dos réplicas de tres para cada condición. Posteriormente se llevó a cabo una normalización de los datos correspondientes a las

intensidades, transformándolos mediante el cálculo de su logaritmo en base 2. Finalmente, se realizó una prueba two-way ANOVA con la finalidad de establecer las siguientes comparaciones múltiples en las tres condiciones de nuestro experimento:

- i) Control frente a la concentración 5 $\mu\text{g/L}$ de la mezcla plata-cadmio.
- ii) Control frente a la concentración 50 $\mu\text{g/L}$ de la mezcla plata-cadmio.
- iii) Concentración 5 $\mu\text{g/L}$ frente a la concentración 50 $\mu\text{g/L}$ de la mezcla plata-cadmio.

La prueba estadística two-way ANOVA consiste en el análisis bidireccional de la varianza, y se llevó a cabo mediante una prueba Tukey con un intervalo de confianza del 95%. El grado de significación se representa como: *, ($p < 0,05$); **, ($p < 0,01$); ***, ($p < 0,001$).

4. Resultados

4.1. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

En este trabajo se ha llevado a cabo un análisis metaproteómico de la población bacteriana de sedimentos de un sistema de microcosmos acuático artificial con el fin de evaluar el efecto de la combinación de los metales plata y cadmio sobre el patrón de expresión de las proteínas de dicha población. Para el estudio fue preciso realizar el aislamiento de los microorganismos, la extracción de proteínas y el uso de la espectrometría de masas para su identificación.

Las extracciones se llevaron a cabo siguiendo el protocolo indicado en el Apartado 3.3 de Materiales y Métodos. La identificación de las proteínas de estas muestras se realizó en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba mediante espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) y búsqueda en bases de datos. Tras la identificación de las proteínas, se realizó un análisis funcional mediante la búsqueda en la base de datos Uniprot, empleando para ello el paquete UniprotR de R, con el objetivo de asignar identificaciones taxonómicas y funciones biológicas de estas proteínas.

Los resultados del análisis taxonómico pueden verse en las siguientes gráficas de sectores (Ilustración 2), en las cuales las proteínas identificadas se han clasificado según la familia microbiana a la que pertenecen. Como podemos ver, no existen diferencias significativas en cuanto a la distribución de las familias, siendo *Rhizobiaceae* la más representada (52-59%) en las tres condiciones experimentales (control, exposición leve y exposición aguda a la mezcla de metales). Las siguientes familias con una mayor representación son *Rhodobacteraceae* (16-19%), *Rhodospirillaceae* (8-9%), *Xanthomonadaceae* (5-8%) y *Pseudomonadaceae* (3-6%). Por otra parte, el resto de las familias no alcanzan una proporción superior al 1% del total.

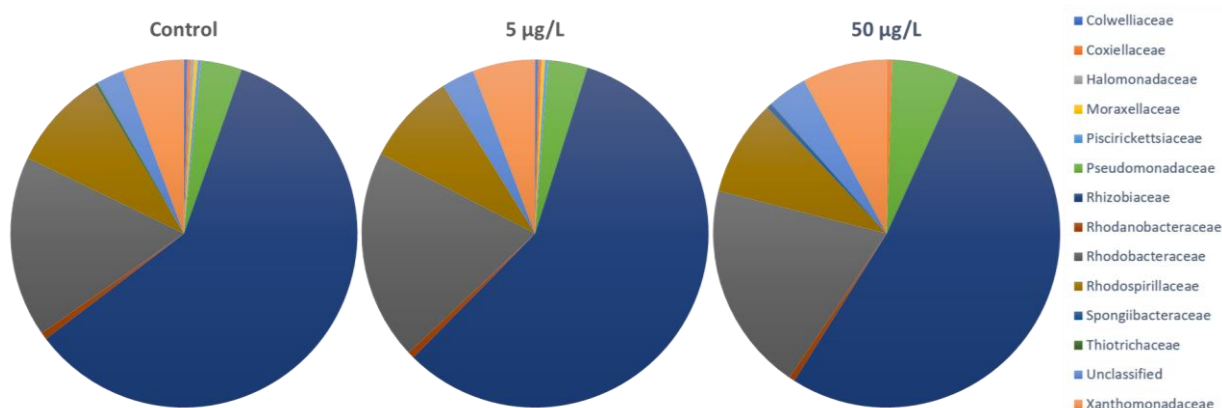


Ilustración 2. Clasificación taxonómica a nivel de familia de las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas. Se muestran las gráficas de sectores de la clasificación de las familias bacterianas identificadas en las tres condiciones experimentales estudiadas (0, 5 y 50 µg/L de la mezcla de metales plata-cadmio).

A pesar de no encontrar diferencias significativas en la proporción en la que encontramos a las distintas familias en las tres condiciones, si analizamos el número de identificaciones de cada una de ellas podemos apreciar cómo a medida que aumenta la concentración de la combinación de metales va disminuyendo la diversidad microbiana, encontrando 12 familias distintas en el control sin exponer, 10 en el caso de la exposición leve a metales y 8 en la concentración aguda. También cabe destacar la existencia de un descenso en el número de identificaciones de la mayoría de las familias en el caso de la concentración aguda (50 µg/L) con respecto al control y a la concentración leve de la mezcla de metales (5 µg/L) (Tabla 1). No obstante, las familias que muestran una tendencia a disminuir su presencia ante la exposición a la concentración aguda de la mezcla de metales no están especialmente representadas (como podría ser el caso de *Colwelliaceae* o *Halomonadaceae*), suponiendo cada una de ellas entre un 0-1% del total.

Por otra parte, cabe destacar la aparición de la familia *Spongiibacteraceae* en la condición de exposición aguda a plata-cadmio (Tabla 1), si bien esta familia no representa más del 1% del total de las familias microbianas identificadas en esta condición.

Tabla 1. Número de identificaciones de las familias de bacterias reconocidas tras la identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas. Se muestra el número de identificaciones para las tres condiciones: 0, 5 y 50 µg/L de la mezcla de metales plata-cadmio.

Familia	Número de identificaciones		
	Control	5 µg/L	50 µg/L
<i>Colwelliaceae</i>	1	1	0
<i>Coxiellaceae</i>	1	1	1
<i>Halomonadaceae</i>	1	0	0
<i>Moraxellaceae</i>	1	1	0
<i>Piscirickettsiaceae</i>	1	1	0
<i>Pseudomonadaceae</i>	12	12	12
<i>Rhizobiaceae</i>	186	188	99
<i>Rhodanobacteraceae</i>	2	2	1
<i>Rhodobacteraceae</i>	53	64	37
<i>Rhodospirillaceae</i>	29	28	17
<i>Spongiibacteraceae</i>	0	0	1
<i>Thiotrichaceae</i>	1	0	0
<i>Unclassified</i>	8	10	7
<i>Xanthomonadaceae</i>	18	19	15

4.2. Proteínas y procesos biológicos afectados por la exposición a la mezcla de metales

Tras el estudio taxonómico, se llevó a cabo un análisis estadístico con el fin de identificar los cambios significativos en el patrón de expresión de proteínas entre las distintas concentraciones, 0, 5 y 50 µg/L, de la mezcla de metales Ag- Cd estudiadas. En la Tabla 2 se muestra el listado de proteínas que mostraron cambios estadísticamente significativos tras la prueba two-way ANOVA. Para cada proteína se indica el código identificativo de Uniprot correspondiente, su descripción, el organismo al que pertenece y el proceso biológico en el que interviene. Estos datos han sido empleados para obtener distintas representaciones gráficas que faciliten la discusión sobre el significado biológico de los cambios de expresión detectados, así como su posible correlación con la exposición a los metales pesados plata y cadmio.

Tabla 2. Proteínas de la población bacteriana que muestran cambios significativos entre las distintas condiciones ensayadas. Para cada proteína se indica el código identificativo de Uniprot, la descripción, el organismo al que pertenece y el proceso biológico en el que participa.

Código Uniprot	Descripción	Organismo	Proceso biológico
A0A657LR44	Bacterioferritina	<i>Pararhizobium antarcticum</i>	Transporte a través de membranas
A0A3S3SWY4	Aminopeptidasa	<i>Rhizobium sp.</i>	Unión a metales
A0A4R3G0N3	Proteína periplasmática de unión a putrescina	<i>Rhizobium sp.</i>	Transporte a través de membranas
A0A2B8BBE0	Transportador ABC	<i>Azospirillum palustre</i>	Transporte a través de membranas
A0A1M7J015	Proteína de la familia Band 7 (dominio SPFH)	<i>Labrenzia suaedae</i>	Componente de membrana
A0A5E7YJ88	Factor sigma ARN polimerasa	<i>Rhizobium sp.</i>	Transcripción Respuesta a estrés
A0A1S2DWS8	Transportador ABC	<i>Agrobacterium vitis</i>	Transporte a través de membranas
C3MD19	Factor de elongación (Transcripción)	<i>Sinorhizobium fredii</i>	Transcripción
A0A1G3F3X8	Proteína ribosomal 30S	<i>Pseudomonadales bacterium</i>	Metabolismo
A0A0Q6S159	Transportador ABC	<i>Rhizobium sp.</i>	Transporte a través de membranas
A0A508X2W1	Transaldolasa (probable)	<i>Sinorhizobium medicae</i>	Metabolismo
A0A521E9E1	Acetoacetato descarboxilasa (probable)	<i>Paracoccus laeviglucosivorans</i>	Metabolismo
A0A2T3WQQ1	Receptor dependiente de TonB	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	Componente de membrana
A0A1C3VKN5	Lipoproteína	<i>Rhizobium miluonense</i>	Componente de membrana
A0A4S8NA39	Aconitato hidratasa	<i>Rhizobium sp.</i>	Metabolismo
A0A285UMR2	Lipoproteína	<i>Rhizobium subbaraonis</i>	Componente de membrana

A0A222K4M1	Fructosa-bisfosfato aldolasa	<i>Rhizobium meliloti</i>	Metabolismo
A0A418SVA5	D-3-fosfoglicerato dehidrogenasa	<i>Paracoccus sp.</i>	Metabolismo
A0A2C6AP46	Tiamina-fosfato sintasa	<i>Rhizobium radiobacter</i>	Metabolismo
A0A378ZZI5	Proteína UgpC de unión a ATP	<i>Pannonibacter phragmitetus</i>	Transporte a través de membranas
A0A1E4KFA9	Proteína con dominio OmpA-like	<i>Xanthomonadaceae bacterium</i>	Transporte a través de membranas
A0A0Q8B0A5	Proteína no caracterizada	<i>Rhizobium sp.</i>	Componente de membrana
A0A522RZD7	Proteína de la familia NifU	<i>Rhizobiaceae bacterium</i>	Unión a metales
A0A5P8YYL5	UDP-N-acetil-alfa-D-glucosamina C6 deshidratasa	<i>Roseivivax sp.</i>	Otros
A0A2S0V4I6	Proteína de unión a ADN monocatenario	<i>Colwellia sp.</i>	Respuesta a estrés
A0A2N0CY51	Subunidad beta de la ARN polimerasa	<i>Rhizobium sllae</i>	Transcripción
A0A6N7L7X0	Proteína con el dominio catalítico alcohol deshidrogenasa	<i>Sinorhizobium teranga</i>	Unión a metales
A0A1N6P2E6	Subunidad B de la aspartil/glutamil-tRNA(Asn/Gln) amidotransferasa	<i>Rhizobium sp.</i>	Metabolismo
A0A285XH21	UTP--glucosa-1-fosfato uridililtransferasa	<i>Ensifer adhaerens</i>	Metabolismo
A0A1M3Q3F4	Proteína con dominio OmpA-like	<i>Rhizobium sp.</i>	Componente de membrana
A0A2U8FZC7	Quinolinato fosfo-ribosiltransferasa	<i>Sinorhizobium fredii</i>	Metabolismo
A0A3B7M6S6	Proteína familia FixA/subunidad beta de flavoproteína	<i>Acinetobacter sp.</i>	Transferencia de electrones
A0A2T0P0B7	Proteína de unión a fosfato PstS	<i>Rhizobium tropici</i>	Transporte a través de membranas
A0A2U2DLX0	Subunidad de unión a ATP de ATPasa de transporte de potasio	<i>Rhizobium album</i>	Transducción de señales
A0A1M5A4I1	Ketol-acid reductoisomerasa (NADP ⁺)	<i>Kaistia soli</i>	Metabolismo
A0A024IYB2	Transportador ABC	<i>Rhizobium radiobacter</i>	Transporte a través de membranas
A0A522R6E9	Glutamato 5-quinasa	<i>Rhizobiaceae bacterium</i>	Metabolismo

A continuación, comparamos de manera global el número de proteínas identificadas para cada condición antes y después del análisis estadístico. Tal y como muestra la Ilustración 3, de las 419 proteínas identificadas (aquellas proteínas identificadas mediante espectrometría de masas que están presentes en al menos dos de tres réplicas para la condición correspondiente), 134 se expresan bajo todas las condiciones, 62 en la situación control, 63 bajo la concentración leve de la combinación de metales y 16 en la exposición aguda a la mezcla plata-cadmio. Por otra parte, existen 104 proteínas que se expresan tanto en el control como en el experimento de exposición a concentración leve, 26 en los experimentos de exposición a 5 µg/L y 50 µg/L de la mezcla de metales y, únicamente, 14 proteínas tanto en control como en el experimento de exposición aguda.

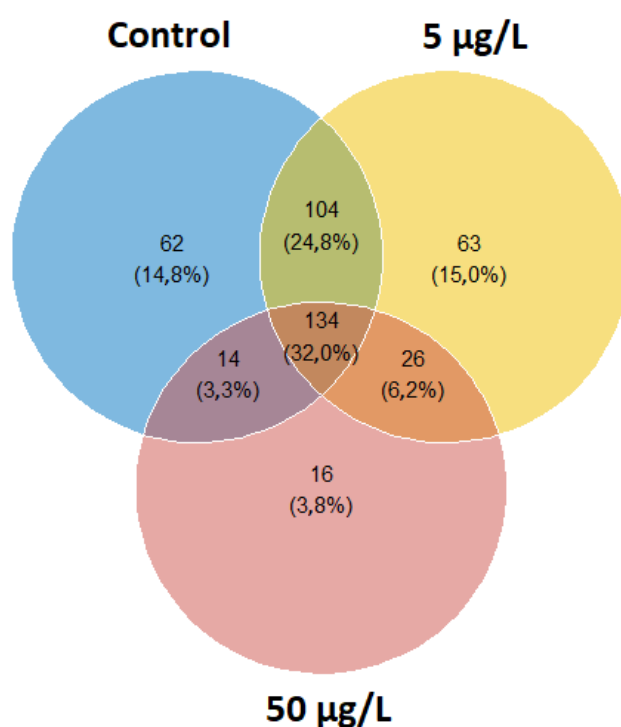


Ilustración 3. Diagrama de Venn de las proteínas totales identificadas mediante espectrometría de masas. Se muestra el solapamiento de las proteínas que se expresan en más de una condición (0, 5 y 50 µg/L), indicándose tanto el número de proteínas como el porcentaje que suponen. Únicamente se han dado por válidas aquellas proteínas que estaban presentes en al menos dos de las tres réplicas para la condición correspondiente.

La Ilustración 4 se corresponde con un diagrama de Venn para aquellas proteínas que mostraron cambios significativos tras el análisis estadístico. En este caso encontramos 5 proteínas que se expresan en las tres condiciones, 8 en el control, 13 en el caso de la concentración leve de metales y 3 en el experimento de exposición aguda a metales. Por otra parte, 7 de estas proteínas se expresan tanto en el control como en el experimento de exposición a concentración leve y 1 en los experimentos de exposición a 5 µg/L y 50 µg/L de la mezcla de metales, mientras que no existen proteínas que se expresen simultáneamente en la condición control y en el experimento de exposición aguda a la mezcla cadmio-plata y presenten cambios estadísticamente significativos.

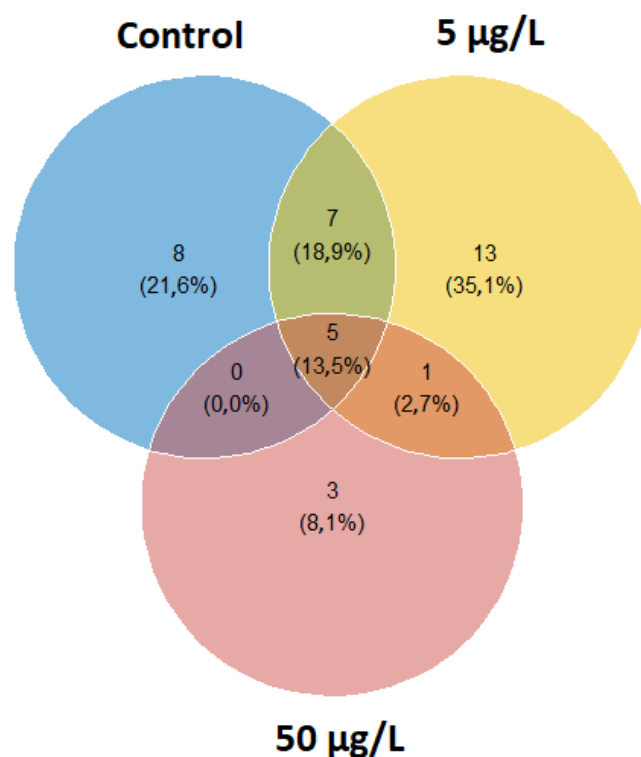


Ilustración 4. Diagrama de Venn de las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas que mostraron cambios significativos. Se muestra el solapamiento de las proteínas que se expresan en más de una condición (0, 5 y 50 µg/L), indicándose tanto el número de proteínas como el porcentaje que suponen.

Cabe destacar el bajo número de proteínas que se expresan únicamente ante la exposición aguda a metales en ambos casos al comparar con la condición control y la exposición leve. De la misma forma, no existe un gran número de proteínas que se expresen tanto en la condición control como en la condición de exposición aguda, mientras que sí existe un mayor número de proteínas que se expresan simultáneamente en la condición control y en la concentración 5 µg/L.

En la Ilustración 5 se pueden observar los resultados obtenidos tras agrupar a las proteínas de la Tabla 2 según el proceso biológico en el que intervienen. Cabe destacar la pérdida de la diversidad de funciones biológicas en la concentración 50 µg/L de la mezcla de metales pesados con respecto al control sin exponer y a la concentración 5 µg/L. Procesos biológicos relacionados con la unión a metales, la respuesta a estrés, el metabolismo y el transporte a través de membrana disminuyen en el experimento de exposición a la concentración aguda de metales con respecto a las otras condiciones estudiadas. Por otro lado, el proceso de transcripción está incrementado a las dos concentraciones de la mezcla de metales respecto al control.

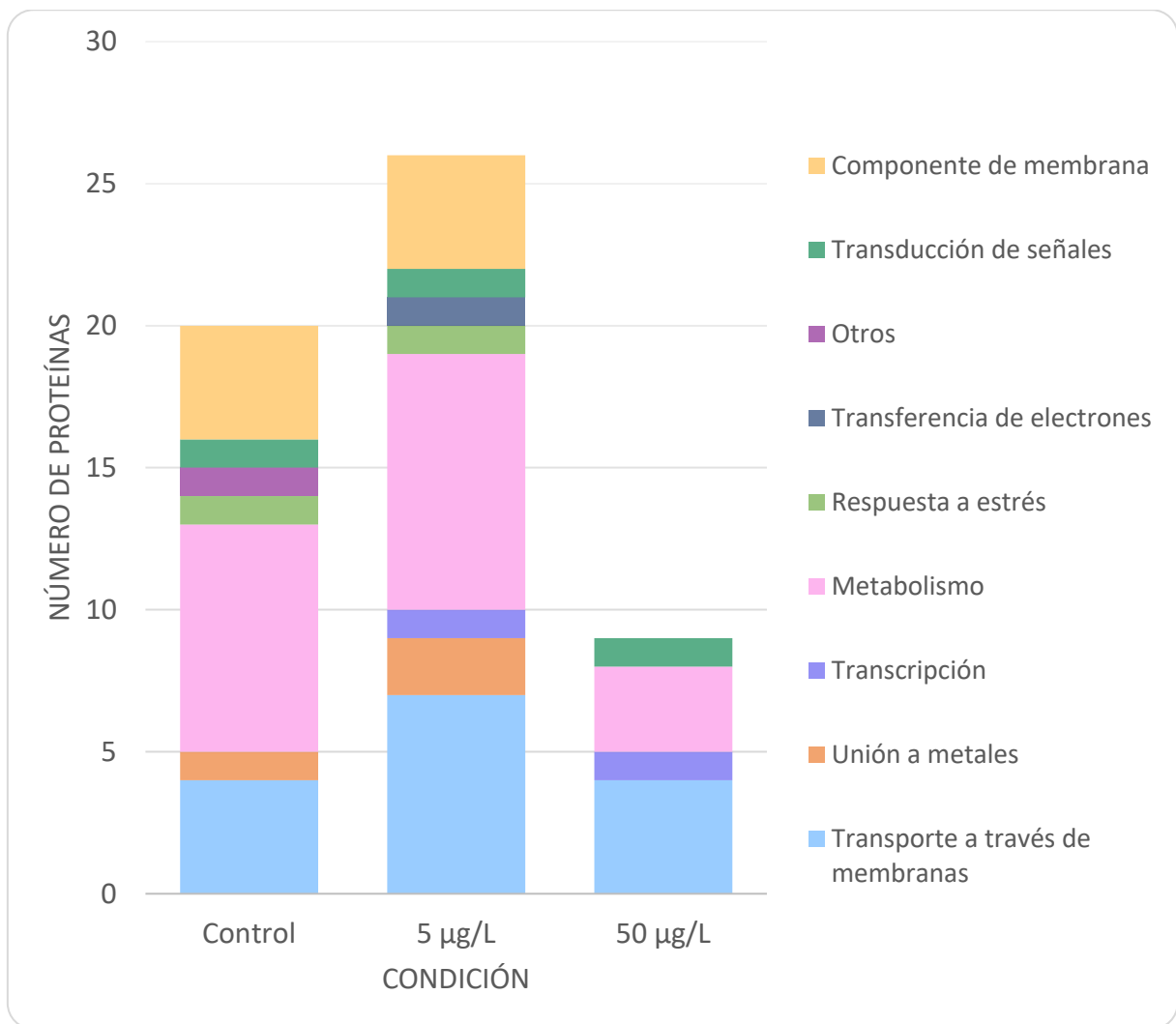


Ilustración 5. Clasificación de las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas según el proceso biológico en el que intervienen. Se muestra el patrón de la diversidad de funciones biológicas para cada una de las tres condiciones estudiadas: 0, 5 y 50 µg/L de la mezcla de Ag-Cd. Únicamente se representan los procesos biológicos en los que intervienen las proteínas que mostraron diferencias significativas en función del tratamiento.

A pesar de poder apreciar diferencias en el patrón de expresión de proteínas en función de la concentración de metales, el número de proteínas que mostraron cambios significativos es bajo, por lo que no podemos extraer conclusiones concluyentes a nivel de función.

4.3. Análisis de clústeres

El análisis de clústeres nos permite agrupar objetos por similitud, de forma que los miembros del mismo grupo tendrán comportamientos similares (Meunier et al., 2007). En nuestro caso, el análisis permitió agrupar a las proteínas según su patrón de expresión en las tres

condiciones estudiadas, 0, 5 y 50 µg/L de la mezcla de metales plata y cadmio, tal y como puede verse en la Ilustración 6.

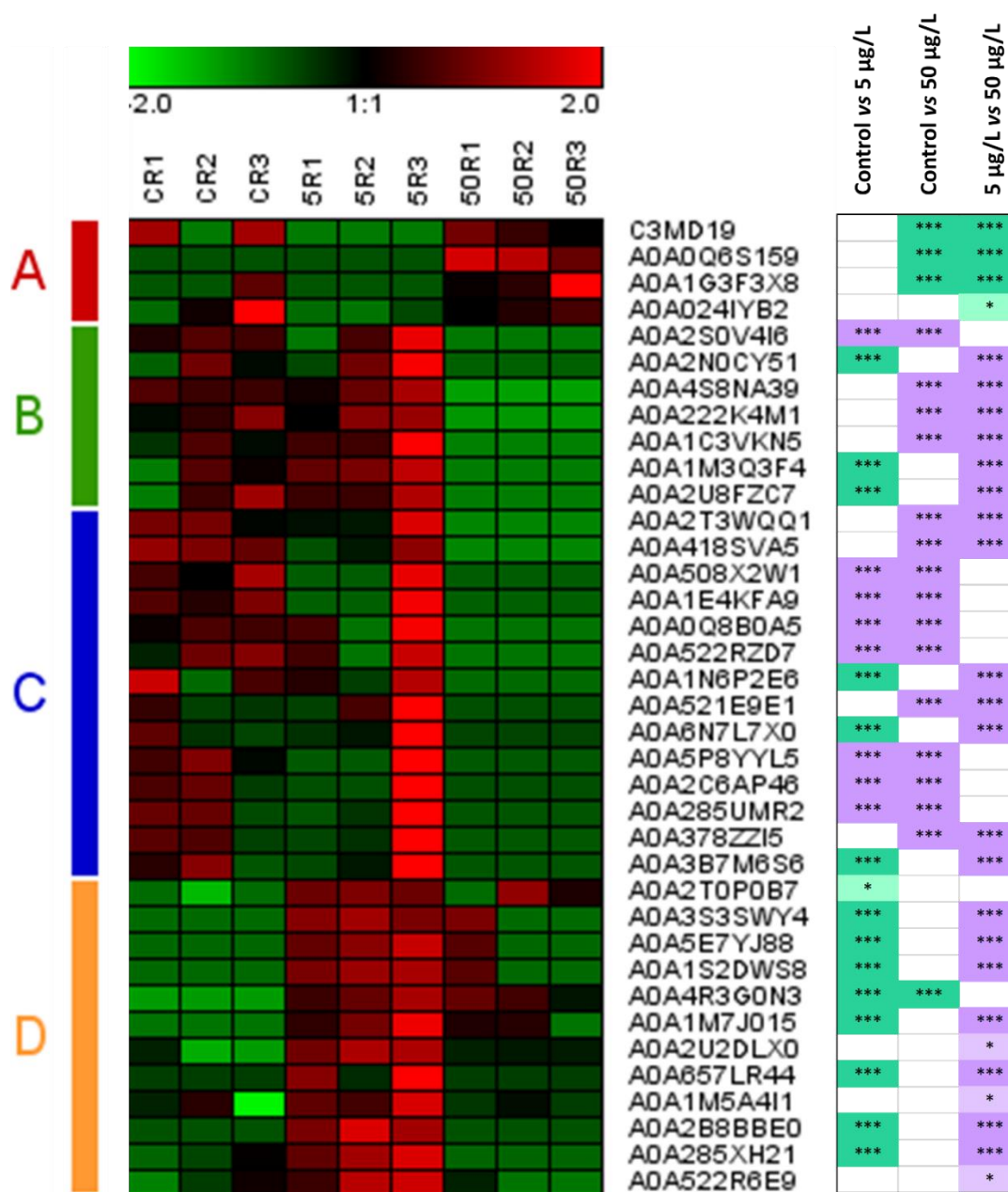


Ilustración 6. Análisis de clústeres de las proteínas que muestran cambios significativos en su patrón de expresión. A la izquierda se muestra el análisis de clústeres de las proteínas que muestran una expresión diferencial ≥ 2 -veces al comparar las tres condiciones, 0, 5 y 50 µg/L. Cada fila representa una proteína distinta. Los rectángulos verdes indican una menor intensidad relativa con respecto al resto de condiciones, mientras que los rectángulos rojos muestran una mayor intensidad. La intensidad de ambos colores es proporcional al número de veces de cambio, tal y como se muestra en la escala. Las proteínas se agrupan en cuatro clústeres: A, B, C y D. A la derecha se muestra una tabla que describe la significación estadística de los cambios. El grado de significación se representa como: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Las proteínas obtenidas tras el análisis estadístico se agruparon en cuatro clústeres: A, B, C y D. Es de interés estudiar si los clústeres resultantes están constituidos por proteínas que se asocian con el mismo proceso biológico, lo cual indicaría si existen procesos biológicos de la población microbiana bacteriana que se vean alterados siguiendo algún patrón común tras la exposición a la mezcla de los contaminantes plata y cadmio. De esta manera, las proteínas que constituyen el clúster A se asocian con el metabolismo y el transporte, al igual que ocurre en el clúster D. Por otra parte, en los clústeres B y C no existen procesos biológicos que estén especialmente representados.

Las proteínas que constituyen el clúster A aumentan considerablemente su expresión a la concentración 50 µg/L con respecto al control y a la concentración leve, lo cual indicaría que los procesos biológicos de biosíntesis de proteínas y transporte aumentan a concentraciones agudas de la mezcla de metales. En cambio, las proteínas que integran el clúster D se caracterizan por aumentar su expresión a bajas concentraciones de la mezcla de metales con respecto al control, mientras que a concentraciones agudas la expresión disminuye y alcanza niveles similares al control. Finalmente, las proteínas de los clústeres B y C se caracterizan por la disminución de su expresión a medida que aumenta la concentración de plata-cadmio.

5. Discusión

Los resultados de la identificación de las familias microbianas a partir de las proteínas identificadas por espectrometría de masas muestran cómo disminuye la diversidad microbiana al incrementar la concentración de la mezcla de los metales plata y cadmio. Las sustancias tóxicas pueden originar cambios en la composición y diversidad de las comunidades microbianas, alta variabilidad espacio-temporal y una alteración de la funcionalidad de dichas comunidades (Chakraborty & Bhadury, 2015). Estudios previos han relacionado la contaminación por metales pesados con una pérdida de la diversidad microbiana tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos (J. Zhao et al., 2014; X. Zhao et al., 2020). En principio, la composición y la diversidad de las comunidades microbianas podrían funcionar como biomarcadores de contaminación de las aguas, de forma que la monitorización de estos cambios resultaría de gran interés en estudios toxicológicos (J. Zhao et al., 2014).

Se han llevado a cabo estudios en suelos contaminados por metales pesados y se ha detectado una mayor presencia de los filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Acidobacteria* (Hemmat-Jou et al., 2018). De esta manera, estos filos podrían emplearse como bioindicadores de contaminación por metales pesados. Esta metodología puede extrapolarse a otros taxones, como órdenes o familias; y a otros ecosistemas, como sería el caso de los ecosistemas acuáticos (Hong et al., 2020).

En nuestro estudio, nos hemos centrado en el análisis por familias microbianas inferidas a partir de la identificación de proteínas, de forma que las familias *Rhizobiaceae*, *Rhodobacteraceae* y *Rhodospirillaceae* son las más representadas en las tres condiciones estudiadas (0, 5 y 50 µg/L) y las que presentan una mayor variación en el número de identificaciones al comparar la exposición aguda con el control y la exposición leve, disminuyendo a elevadas concentraciones de la combinación de los metales pesados plata y cadmio. No obstante, estas variaciones no son especialmente significativas y la mayor parte de las familias identificadas están muy poco representadas, por lo que extraer conclusiones en base a cambios en el número de identificaciones para cada familia no es del todo apropiado. Aun así, el descenso en el número de identificaciones puede deberse a que metales como la plata, el plomo, el cromo o el cadmio son tóxicos para los microorganismos (Roane et al., 2015). Entre los efectos tóxicos de estos contaminantes encontramos el desplazamiento de metales esenciales de su sitio de unión. Un ejemplo de esto sería el desplazamiento del cinc llevado a cabo por el cadmio, lo cual da lugar a la inactivación de algunas enzimas (Roane et al., 2015). Por otra parte, se ha visto que metales como el cadmio pueden provocar efectos

mutagénicos en distintos microorganismos, lo cual puede desembocar en alteraciones fisiológicas e incluso la muerte (Bischoff, 1982). Por ello, la valoración y el estudio de estas familias como posibles organismos bioindicadores sería de interés en futuros estudios ecotoxicológicos.

Cabe destacar que únicamente existe una familia cuya presencia es mayor a concentraciones agudas de la mezcla plata-cadmio que en el resto de las condiciones. Este es el caso de la familia *Spongiibacteraceae*, la cual aparece únicamente a altas concentraciones. Aunque esta familia no representa más del 1% del total de las familias microbianas identificadas en esta condición, el aumento en el número de identificaciones (este aumento podría llegar incluso a ser despreciable) podría deberse a que en este caso los metales plata y/o cadmio estén desempeñando alguna función biológica relevante. Por ejemplo, existen estudios que han demostrado que a pesar de que el cadmio no es considerado como un metal esencial, existen microorganismos capaces de emplearlo para mantener la actividad de sus enzimas cuando el metal necesario no está disponible (Roane et al., 2015).

Respecto a la funcionalidad de las proteínas identificadas por espectrometría de masas, los diagramas de Venn nos han permitido ver cómo el número de proteínas expresadas a una concentración aguda de la combinación plata-cadmio es menor que en la situación control y ante la exposición a una concentración leve. Además, si analizamos los procesos biológicos identificados en cada una de las condiciones, vemos cómo disminuye número de funciones biológicas al exponer a la comunidad microbiana a concentraciones elevadas, 50 µg/L, de la mezcla plata-cadmio. Estudios previos han determinado que la exposición de las poblaciones microbianas de suelo a metales pesados resulta en una pérdida de la diversidad tanto estructural como funcional debido a los efectos tóxicos de estos contaminantes (Singh et al., 2014).

Por otra parte, podemos apreciar un ligero aumento tanto en el número de proteínas identificadas como en el número de funciones biológicas asociadas en el caso del experimento de exposición leve a contaminantes con respecto al control. Esto podría deberse a que ante la exposición a concentraciones subletales de metales algunos microorganismos pueden activar mecanismos de resistencia que aumentan su tolerancia a los contaminantes (Roane et al., 2015). Existen diversos mecanismos de resistencia que los microorganismos pueden poner en marcha tras la exposición a metales pesados, entre ellos: la reducción de la permeabilidad a metales, el transporte de metales hacia el exterior de la célula, el secuestro intracelular de metales por parte de proteínas de unión a metales y la detoxificación (Bruins et al., 2000).

En nuestro caso, las funciones que aparecen especialmente más representadas en la concentración leve que en el control son el transporte y la unión a metales, ambos mecanismos propios de la resistencia a metales pesados. El transporte activo de metales constituye un mecanismo muy recurrente en la resistencia frente a estos contaminantes, permitiendo exportar los metales desde el citoplasma al exterior de la célula microbiana (Bruins et al., 2000). Por otra parte, el secuestro intracelular consiste en la acumulación de metales en el citoplasma para evitar la exposición de componentes celulares esenciales a estos contaminantes (Bruins et al., 2000).

Como podemos ver en la Ilustración 5, el proceso de transcripción está incrementado en las dos concentraciones de la mezcla de metales con respecto al control. En algunas bacterias, existen mecanismos de resistencia a metales pesados regulados por factores de transcripción, como por ejemplo los factores de las familias MerR (sistemas de resistencia a mercurio) o CadR (sistemas de resistencia a cadmio) (Permina et al., 2006). La exposición a metales pesados como el cadmio, la plata o el cinc activa a estos factores de transcripción, los cuales regularán la activación o represión de genes que permitan poner en marcha la activación de mecanismos (Permina et al., 2006). En nuestro caso, el incremento del proceso de transcripción podría deberse a que la exposición de las poblaciones de microorganismos a la mezcla plata-cadmio resultaría en una activación de este tipo de factores de transcripción y, en consecuencia, en la activación de la transcripción de genes de resistencia.

El descenso de las funciones de transporte a través de membrana, unión a metales, respuesta a estrés y metabolismo tras la exposición a concentración aguda de 50 µg/L que podemos apreciar en la Ilustración 5, podría deberse a un desequilibrio entre los efectos tóxicos de los metales pesados y los mecanismos de resistencia de los microorganismos, los cuales podrían verse superados a altas concentraciones de contaminantes. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de una sustancia tóxica es la concentración más baja de esa sustancia que puede detener el crecimiento microbiano (Manasi et al., 2016). Concentraciones iguales o superiores a la CMI pueden dar lugar a la inhibición total del crecimiento, lo cual podría corresponderse con una pérdida de la diversidad de funciones (González Henao & Ghneim-Herrera, 2021).

No obstante, a pesar de poder apreciar diferencias sutiles en el patrón de expresión de las proteínas en función de la concentración de metal estudiada, el número de proteínas que mostraron cambios significativos es bajo, y, por tanto, la variedad y el número de funciones

identificadas es pequeño. Por estas razones no podemos afirmar con seguridad que los resultados sean concluyentes.

El análisis de clústeres muestra cómo las proteínas del clúster A aumentan su expresión a la concentración más elevada de la mezcla de metales. Las funciones más representadas en este clúster son el transporte y el metabolismo. Como hemos visto anteriormente, el transporte de metales hacia el exterior celular constituye un mecanismo de defensa frente a la exposición de metales. Además, un aumento del metabolismo podría corresponderse con una mayor síntesis de componentes implicados en los mecanismos de resistencia, como podría ser la síntesis de glutatión (Coblentz & Wolf, 1994), y otras defensas antioxidativas. De manera similar, el clúster D se caracteriza por una mayor presencia de procesos biológicos relacionados con el transporte ante la exposición a la concentración leve de la combinación de metales, que de nuevo podrían corresponderse con mecanismos de resistencia a metales.

En definitiva, este trabajo nos ha permitido realizar una aproximación metaproteómica para evaluar los efectos de la contaminación de ecosistemas acuáticos por una mezcla de metales pesados, plata y cadmio. Las variaciones en el patrón de microorganismos identificados en función de la exposición a distintas concentraciones de metales pueden emplearse como biomarcador de contaminación. Además, el estudio de los cambios en el patrón de expresión de las proteínas de las poblaciones microbianas identificadas por espectrometría de masas es de especial interés como biomarcador de contaminación ambiental, ya que nos permite analizar los cambios funcionales y metabólicos que tienen lugar en los microorganismos en función de la concentración de contaminante a la que se vean expuestos. Este interés reside en que, en muchas ocasiones, un cambio en la diversidad microbiana no implica un cambio en la funcionalidad, ya que existen especies microbianas con funciones redundantes (Allison & Martiny, 2008).

La mejora de los protocolos de extracción de las proteínas, de las bases de datos y de las herramientas bioinformáticas nos permitirán llevar a cabo estudios más precisos que nos informen sobre los mecanismos de toxicidad de los contaminantes. Esto podría permitir también la predicción de las respuestas funcionales que tienen lugar bajo la exposición a distintos estímulos ambientales.

6. Conclusiones

- La exposición a la combinación de los metales plata y cadmio supone una disminución en la presencia y la diversidad de las familias de microorganismos a las que pertenecen las proteínas identificadas. Así, las familias *Rhizobiaceae*, *Rhodobacteraceae* y *Rhodospirillaceae* disminuyen a concentraciones agudas de la mezcla (50 µg/L).
- La exposición a la concentración más baja (5 µg/L) de la mezcla plata-cadmio dio lugar a un aumento en el número y la diversidad funcional de las proteínas, que podría relacionarse con la puesta en marcha de mecanismos de resistencia, destacando los procesos biológicos de transporte y unión a metales.
- La exposición a la concentración más elevada de la mezcla de metales provocó una disminución en el número y la diversidad de funciones proteicas que podría indicar que las bacterias tienen sus mecanismos de defensa comprometidos como consecuencia de la exposición a concentraciones agudas de plata y cadmio.
- Los patrones de expresión de proteínas identificadas en este trabajo, y los procesos biológicos afectados, podrían emplearse como biomarcadores de contaminación ambiental en respuesta a la mezcla de metales pesados plata y cadmio.

Bibliografía

- Aggarwal, S., & Yadav, A. (2016). False Discovery Rate Estimation in Proteomics. *Methods In Molecular Biology*, 119-128. doi: 10.1007/978-1-4939-3106-4_7
- Allison, S. D., & Martiny, J. B. (2008). Colloquium paper: resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 Suppl 1(Suppl 1), 11512–11519. doi: 0.1073/pnas.0801925105
- Alonso Castillo, M. L., Sánchez Trujillo, I., Vereda Alonso, E., García de Torres, A., & Cano Pavón, J. M. (2013). Bioavailability of heavy metals in water and sediments from a typical Mediterranean Bay (Málaga Bay, Region of Andalucía, Southern Spain). *Marine Pollution Bulletin*, 76(1–2), 427–434. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.08.031>
- Amoatey, P., & Baawain, M. S. (2019). Effects of pollution on freshwater aquatic organisms. *Water Environment Research*, 91(10), 1272–1287. <https://doi.org/10.1002/wer.1221>
- Bischoff, B. (1982). Effects of cadmium on microorganisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 6(2), 157–165. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(82\)90003-3](https://doi.org/10.1016/0147-6513(82)90003-3)
- Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(3), 198–207. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1860>
- Chakraborty, A., & Bhadury, P. (2015). Effect of Pollution on Aquatic Microbial Diversity. 53–75. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19018-1_3
- Coblenz, A., & Wolf, K. (1994). The role of glutathione biosynthesis in heavy metal resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiology Reviews*, 14(4), 303-308. doi: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00103.x
- Domon, B., & Aebersold, R. (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, 312(5771), 212–217. <https://doi.org/10.1126/science.1124619>
- Dudley, E., & Bond, A. E. (2014). Phosphoproteomic techniques and applications. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (1st ed., Vol. 95). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800453-1.00002-6>
- Experimental, N. E. W., & Aquatic, T. O. (1994). Ute Traub-Eberhard*, Harald Schtifer and Reinhard Debus (*. 28(3), 501–510.

- Fierros-Romero, G., Gómez-Ramírez, M., Sharma, A., Pless, R. C., & Rojas-Avelizapa, N. G. (2020). *czcD* gene from *Bacillus megaterium* and *Microbacterium liquefaciens* as a potential nickel–vanadium soil pollution biomarker. *Journal of Basic Microbiology*, 60(1), 22–26. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900323>
- González Henao, S., & Ghneim-Herrera, T. (2021). Heavy Metals in Soils and the Remediation Potential of Bacteria Associated With the Plant Microbiome. *Frontiers in Environmental Science*, 9(April), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.604216>
- Häder, D. P., Banaszak, A. T., Villafañe, V. E., Narvarte, M. A., González, R. A., & Helbling, E. W. (2020). Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging problems with global implications. In *Science of the Total Environment* (Vol. 713). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136586>
- Hemmat-Jou, M. H., Safari-Sinegani, A. A., Mirzaie-Asl, A., & Tahmourespour, A. (2018). Analysis of microbial communities in heavy metals-contaminated soils using the metagenomic approach. *Ecotoxicology*, 27(9), 1281–1291. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1981-x>
- Hettich, R. L., Sharma, R., Chourey, K., & Giannone, R. J. (2012). Microbial metaproteomics: Identifying the repertoire of proteins that microorganisms use to compete and cooperate in complex environmental communities. *Current Opinion in Microbiology*, 15(3), 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.04.008>
- Holt, E. A. & Miller, S. W. (2010) Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts. *Nature Education Knowledge* 3(10):8
- Hong, P. Y., Mantilla-Calderon, D., & Wang, C. (2020). Metagenomics as a tool to monitor reclaimed-water quality. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(16), 1–15. <https://doi.org/10.1128/AEM.00724-20>
- Ibanez, J. G., Hernandez-Esparza, M., Doria-Serrano, C., Fregoso-Infante, A., & Singh, M. M. (2007). Effects of Pollutants on the Chemistry of the Atmosphere, Hydrosphere, and Lithosphere. *Environmental Chemistry*, 167–197. https://doi.org/10.1007/978-0-387-31435-8_8
- Islam, M., Ahmed, M., Raknuzzaman, M., Habibullah -Al- Mamun, M., & Islam, M. (2015). Heavy metal pollution in surface water and sediment: A preliminary assessment of an urban

river in a developing country. *Ecological Indicators*, 48, 282-291.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.08.016>

Lionetto, M. G., Caricato, R., & Giordano, M. E. (2019). Pollution Biomarkers in Environmental and Human Biomonitoring. *The Open Biomarkers Journal*, 9(1), 1–9.
<https://doi.org/10.2174/1875318301909010001>

Manasi, Rajesh, N., & Rajesh, V. (2016). Evaluation of the genetic basis of heavy metal resistance in an isolate from electronic industry effluent. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 177–180. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.02.002>

Masindi, V., & Muedi, K. L. (2018). Environmental Contamination by Heavy Metals. In *Heavy Metals*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76082>

Matheson, F. E. (2008). Microcosms. *Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set, 2005*, 2393–2397. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00064-1>

Meunier, B., Dumas, E., Piec, I., Béchet, D., Hébraud, M., & Hocquette, J. F. (2007). Assessment of hierarchical clustering methodologies for proteomic data mining. *Journal of Proteome Research*, 6(1), 358–366. <https://doi.org/10.1021/pr060343h>

Michán, C., Blasco, J., & Alhama, J. (2021). High-throughput molecular analyses of microbiomes as a tool to monitor the wellbeing of aquatic environments. *Microbial Biotechnology*, 14(3), 870–885. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13763>

Mittal, Rahul (2013). Impact of population explosion on environment. *The National Journal*.

Mu, W., Chen, Y., Liu, Y., Pan, X., & Fan, Y. (2018). Toxicological effects of cadmium and lead on two freshwater diatoms. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 59(March), 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.03.013>

Permina, E. A., Kazakov, A. E., Kalinina, O. V., & Gelfand, M. S. (2006). Comparative genomics of regulation of heavy metal resistance in Eubacteria. *BMC Microbiology*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-49>

Rahman, Z., & Singh, V. P. (2019). The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(7).
<https://doi.org/10.1007/s10661-019-7528-7>

- Rai, P. K. (2008). Heavy metal pollution in aquatic ecosystems and its phytoremediation using wetland plants: An ecosustainable approach. In *International Journal of Phytoremediation* (Vol. 10, Issue 2, pp. 133–160). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15226510801913918>
- Roane, T., Pepper, I., & Gentry, T. (2015). Microorganisms and Metal Pollutants. *Environmental Microbiology*, 415-439. doi: 10.1016/b978-0-12-394626-3.00018-1
- Rodea-Palomares, I., González-Pleiter, M., Martín-Betancor, K., Rosal, R., & Fernández-Piñas, F. (2015). Additivity and Interactions in Ecotoxicity of Pollutant Mixtures: Some Patterns, Conclusions, and Open Questions. *Toxics*, 3(4), 342-369. doi: 10.3390/toxics3040342
- Siggins, A., Gunnigle, E., & Abram, F. (2012). Exploring mixed microbial community functioning: Recent advances in metaproteomics. In *FEMS Microbiology Ecology* (Vol. 80, Issue 2, pp. 265–280). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01284.x>
- Singh, B. K., Quince, C., Macdonald, C. A., Khachane, A., Thomas, N., Al-Soud, W. A., Sørensen, S. J., He, Z., White, D., Sinclair, A., Crooks, B., Zhou, J., & Campbell, C. D. (2014). Loss of microbial diversity in soils is coincident with reductions in some specialized functions. *Environmental Microbiology*, 16(8), 2408–2420. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12353>
- Soudy, M., Anwar, A. M., Ahmed, E. A., Osama, A., Ezzeldin, S., Mahgoub, S., & Magdeldin, S. (2020). UniprotR: Retrieving and visualizing protein sequence and functional information from Universal Protein Resource (UniProt knowledgebase). *Journal of Proteomics*, 213(November 2019), 103613. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103613>
- Traub-Eberhard, U., Schäfer, H., & Debus, R. (1994). New experimental approach to aquatic microcosm systems. *Chemosphere*, 28(3), 501-510. doi: 10.1016/0045-6535(94)90294-1
- Wang, D. Z., Kong, L. F., Li, Y. Y., & Xie, Z. X. (2016). Environmental microbial community proteomics: Status, challenges and perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms17081275>
- Wilmes, P., & Bond, P. L. (2006). Metaproteomics: Studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends in Microbiology*, 14(2), 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.12.006>

Zhao, J., Zhao, X., Chao, L., Zhang, W., You, T., & Zhang, J. (2014). Diversity change of microbial communities responding to zinc and arsenic pollution in a river of northeastern China. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 15(7), 670–680. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400003>

Zhao, X., Huang, J., Zhu, X., Chai, J., & Ji, X. (2020). Ecological effects of heavy metal pollution on soil microbial community structure and diversity on both sides of a river around a mining area. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(16), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijerph17165680>

Zhu, R., Zacharias, L., Wooding, K. M., Peng, W., & Mechref, Y. (2017). Glycoprotein Enrichment Analytical Techniques: Advantages and Disadvantages. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 585). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.11.009>