

Traballo Fin de Grao

Efecto da cutícula sobre a captación de  
HAPs no brión *Physcomitrella patens*  
(Hedw.) Bruch & Schimp.

Pablo Colmenero Crispín

Grao en Bioloxía

Curso académico: 2019/2020

Facultade de Bioloxía

Universidade de Santiago de Compostela



DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA  
FUNCIONAL

## ÍNDICE

1. Introducción
2. Obxectivos
3. Material e métodos
  - 3.1. A especie
  - 3.2. O cultivo
    - 3.2.1. *Establecemento do cultivo de P.patens en matraces Erlenmeyer*
    - 3.2.2. *Subcultivos de P.patens en matraces Erlenmeyer*
    - 3.2.3. *Cultivo de P.patens en biorreactores*
  - 3.3. Experimento de carga de HAPs nos clons de *P. patens*
    - 3.3.1. *Preparación dos clons de P.patens*
    - 3.3.2. *Carga de HAPs*
    - 3.3.3. *Determinacións dos HAPs*
4. Resultados e discusión
  - 4.1. Resultados de cultivo en matraces para *P.patens* WT
  - 4.2. Resultados cultivo en Biorreactores
  - 4.3. Resultados na filtración de HAPs con *P.patens*
  - 4.4. Resultados de determinación dos HAPs en *P.patens*
5. Conclusión
6. Bibliografía

## Resumo

Os hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs) son contaminantes presentes na atmosfera, cun aumento xeneralizado nas última décadas e que proveñen da queima de combustibles fósiles. A asimilación de estes compostos no corpo humano pode provocar problemas de saúde que dependendo de múltiples factores poden derivar en cancro. A súa monitorización é, polo tanto, importante para a saúde pública e para a caracterización da contaminación atmosférica. Os resultados presentados neste traballo para os dous clons do brión *Physcomitrella patens* (un deles silvestre e o outro con deficiencia na acumulación de ceras cuticulares) son interesantes para a optimización do cultivo en biorreactores de tamaño medio (12 L). Devanditos resultados son tamén prometedores para seguir investigando na utilidade do brión *P.patens*, como organismo de biomonitorización da contaminación atmosférica captando HAPs grazas as características lipófilas da súa cutícula.

### 1. Introducción

Os hidrocarburos policíclicos aromáticos son un grupo amplo de compostos químicos formados por dous ou máis aneis fusionados de benceno. En contaminación ambiental os HAPs forman parte dos denominados compostos orgánicos persistentes (POPs nas siglas en inglés). A pirólise de materiais con carbono e hidróxeno, como madeira ou combustibles derivados do petróleo e carbón son as fontes de emisión de HAPs a atmosfera. Son fontes naturais de emisión as erupcións volcánicas e os incendios forestais e son fontes antrópicas o tráfico de vehículos, as actividades industriais ou as relacionadas coas calefaccións domésticas. As fontes antrópicas son as responsables do aumento de concentración de HAPs. (Dat and Chang, 2017; Ravindra *et al.*, 2008).

Caracterizar as diferentes e variables propiedades físico-químicas dos HAPs é importante para coñecer o seu comportamento e interacción cando son liberados na atmosfera. Considéranse como de baixo peso molecular os HAPs con 2 ou 3 aneis de benceno con presións de vapor máis altas e, polo tanto, atópanse maioritariamente en fase volátil que lles confire unha menor

toxicidade. Porén, isto provoca que reaccionen con outros contaminantes na atmosfera como ozono ou óxidos de nitróxeno producindo contaminantes de maior toxicidade. Por outra banda os HAPs de elevado peso molecular de 4 ou máis aneis de benceno atópanse en fase de partícula debido ó seu baixo punto de presión de vapor (Kim *et al.* , 2013). Por suposto, non é tan simple e depende de multitude de factores como a zona de emisión, que inflúe na estacionalidade das partículas e a súa deposición. Tamén son factores a ter en conta o clima e a estación. Unha propiedade a destacar dos HAPs é que son lipófilos e hidrofóbicos polo tanto, isto provoca que a súa deposición na biosfera non sexa na auga senón que sexa principalmente como contaminantes no solo (Rengarajan *et al.* , 2015).

Os riscos para a saúde derivados dos HAPs dependen da concentración e do tempo de exposición sendo a asimilación respiratoria a máis importante. Traballos como a minería, metalurxia ou refinerías de petróleo son exemplos de largas exposicións. Por outra banda o fume producido por persoas fumadoras en espazos interiores é unha das causas a ter en conta. A través da inxesta, son máis importantes os alimentos con queimaduras, exceso de tostado, grill e afumados que aqueles alimentos derivados de cultivos que poidan assimilar HAPs a través do solo (Kim *et al.* , 2013).

Os efectos carcinoxénicos, teratoxénicos e xenotoxénicos dos HAPs dependen moito do tempo de exposición, da concentración, da toxicidade dos HAPs e da ruta de asimilación: inxestión, inhalación ou cutánea. O seu papel como axentes canceríxenos está demostrado ben por eles mesmos ou a través de metabolitos reactivos (Cohen *et al.* , 2013, chap. 7). É importante destacar o BaP, Benzo(a)pyrene (Grupo 1) como o principal HAP de efecto canceríxeno que constitúe, ademais, un dos principais compoñente do fume do tabaco. A capacidade do BaP para inducir cancro de pulmón está ben documentada en modelos animais. Estes tumores desenvolto en ratas, ratos e hámsters posúen características morfolóxicas e moleculares similares ás exposicións atopadas en persoas fumadoras (Kasala *et al.* , 2015). A IARC (International Agency for Research on Cancer) calificou no ano 2013 a contaminación ambiental como canceríxena para os humanos (Grupo 1) así como o denominado material particulado atmosférico (PM) incluído

no mesmo grupo (Grupo 1). O PM defínese como unha mestura de partículas sólidas e /ou líquidas (excepto a auga pura) presentes na atmosfera cuxo tamaño pode variar entre 0,001 e 100 $\mu\text{m}^3$ s. Os HAPs clasifícanse como partículas finas presentes no PM<sub>2,5</sub> que designa a partículas inferiores a 2,5  $\mu\text{m}$ . Aínda que poden estar adheridas a outras partículas e atoparse no PM<sub>2,5-10</sub>, superiores a 2,5  $\mu\text{m}$  e inferiores a 10  $\mu\text{m}$  (López Mahía, 2016).

É convinte a monitorización de HAPs na atmosfera xa que presentan un problema de saúde pública importante. Tal e como se especifica no obxectivo 3 da axenda 2030 dos ODS (Obxetivos de Desenvolvemento Sostible) da ONU en reducir o número de mortes producidas pola contaminación da aire, a auga e o solo. Os métodos tradicionais de monitorización de HAPs activos bombean aire a través dun filtro, os datos obtidos nestas mostraxes resultan adecuados pero moi caros, alórganse no tempo e requiren enerxía para realizalas. Os métodos de monitorización de HAPs pasivos consisten nun substrato químico que adsorba os contaminantes pero tamén son caros e os substratos dependen da súa especificidade cos contaminantes. Os brións poden ser empregados como biomonitores de contaminación ambiental, nun principio empregáronse como biomonitores de metais pesados, pero é recente o descubrimento da súa capacidade para captar contaminantes orgánicos de xeito activo (Ares *et al.* , 2011; Capozzi *et al.* , 2016; De Nicola *et al.* , 2013; Foan *et al.* , 2015; Vingiani *et al.* , 2015) e pasivo (De Nicola *et al.* , 2013; Foan *et al.* , 2014; Harmens *et al.* , 2013; Wu *et al.* , 2014). Fixéronse estudos para optimizar o método máis eficaz para captar contaminación empregando brións (Ares *et al.* , 2012). A eficacia das “mosspheres” empregando brión desvitalizado na captación de HAPs respecto a outros métodos de monitorización como dispositivos de mostraxe PM<sub>10</sub> e deposición total comprobouse con *Sphagnum palustre L* (Aboal *et al.* , 2020).

O brión *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp é unha especie empregada como organismo modelo na investigación en fisioloxía vexetal, ecoloxía e evolución. Trátase do primeira planta non vascular da que foi secuenciada por completo o seu xenoma. Recentemente descubriuse en *P.patens* a importancia das rutas pre-lignina para a formación de biopolímeros cuticulares, estas rutas do metabolismo de compostos fenólicos consérvase en plantas vasculares

e posúen un rol crítico na impermeabilidade da cutícula. A matriz lípido-fenólica presente en *P.patens* podería constituír un representante vixente dos antepasado comúns de plantas vasculares, que diversificaron logo da colonización do medio terrestre polas algas carofíceas fai 450 Ma (Renault *et al.* , 2017).

Neste traballo, cultiváronse *in vitro* dúas liñas xeneticamente diferentes do devandito brión na fase haploide do seu ciclo vital. Por un lado, *Physcomitrella patens* silvestre que denominaremos “wild-type” (WT). Por outro lado, un mutante de *Physcomitrella patens* que carece dun transportador ATP binding cassette subfamilia G (ABCG). O fenotipo deste brión, presenta deficiencia na acumulación de ceras cuticulares reducindo a súa tolerancia ó estrés por desecación. A este mutante (Pp-ABCG7) xerado e descrito por (Buda *et al.* , 2013) denominarémolo “absence of wax” (AW).

Non se coñece con exactitude porque os brións funcionan tan ben captando HAPs. Planteouse a hipótese de que os HAPs ao ser lipófilos sean adsorbidos a través da cutícula dos brións. Asumindo isto, non se coñece se esta adsorción é directa ou si existen partículas que median en dita adsorción.

## 2. Obxectivos

Optimizar o cultivo de *Physcomitrella patens* WT e *Physcomitrella patens* AW en matraces e biorreactores.

Estimar a través dunha proba de carga de HAPs en laboratorio, a adsorción de HAPs a través da cutícula de *P.patens* WT e a adsorción dos mesmos en *P.patens* AW. Os HAPs a analizar son os seguintes: N, naftaleno; Acei, acenaftileno; Ace, acenafteno; F, fluoreno; Fe, fenantreno; Ant, antraceno; Fl, fluoranteno; P: pireno; BaAnt: benzo[a]antraceno; Cr: criseno; BbjFl: benzo[b+j]fluoranteno; BkFl: benzo[k]fluoranteno; BePir:benzo[e]pireno; BaPir: benzo[a]pireno; DBahAnt: dibenzo[a,h]antraceno; Ipir: inden[1,2,3-cd]pireno; BghiPer: benzo[ghi]perileno.

### 3. Material e métodos

#### 3.1 A especie

Cultiváronse dous clons do brión *Physcomitrella .patens* (Hedw.) Bruch & Schimp: un clon procedente do cultivo dun espécime silvestre (WT) e outro mutante cun “knockout” dun transportador involucrado na deposición de ceras da cutícula (AW) (Buda *et al.* , 2013). Ambos clones foron facilitados polo “Grupo de Ecofisioloxía Vexetal, Cambio Climático e Medio Ambiente” da Universidade de La Rioja.

#### 3.2 O cultivo

##### 3.2.1 Establecemento do cultivo de *P.patens* en matraces Erlenmeyer.

En condicións de asepsia, baixo campá de fluxo laminar vertical, escolléronse ápices de gametóforo de *P.patens* recibidos en placas de Petri. Iniciáronse cultivos en matraces Erlenmeyer (50 ou 100 mL) cun volume de 30 mL de medio de cultivo Knop (Reski and Abel, 1985). Os gametóforos disgregáronse mecanicamente de dous xeitos: a) mediante un dispositivo Polytron (Montreal, Canada) durante 60 s a 19 000 rpm; ou b) mediante un bisturí en placas de Petri estériles (engadiuse medio Knop cunha pipeta Pasteur ata sumerxir os anacos de gametóforo, e de seguido coa mesma pipeta, inoculáronse os gametóforos disgregados a matraces Erlenmeyer de 100 mL). Posteriormente, realizáronse controis de esterilidade sobre os matraces e incubáronse en cámara de cultivo en axitación 100 rpm (Innova 2300, New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) a 20 °C, fotoperíodo 16 h luz/8 h escuridade e intensidade luminosa 55  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Phillips TLD 25) (Hohe and Reski, 2005).

##### 3.2.2. Subcultivos de *P.patens* en matraces Erlenmeyer

Unha vez deron medrado os brións da sección anterior, realízase o mesmo protocolo de disgregación. A continuación, vertéronse os cultivo en matraces Erlenmeyer 500 mL con 200 mL de medio Knop. Realízanse controis de esterilidade sobre os matraces e incubáronse en cámara de cultivo nas condicións descritas anteriormente. Tras 20 días, cando *P.patens* medra e consume o medio de cultivo repetiuse o protocolo de disgregación mecánica nas condicións descritas

anteriormente. A partir dos matraces Erlenmeyer 500 mL co brión disgregado, xeráronse novos cultivos a partir de diferentes volumes de inóculo en matraces Erlenmeyer 500 mL con 200 mL de medio. Realizáronse controis de esterilidade sobre os matraces e incubáronse en cámara de cultivo nas condicións descritas anteriormente.

Por unha banda unha pequena parte do cultivo empregouse para subcultivar *P.patens* en matraces continuamente. Pola outra, a maior parte de *P.patens* empregouse para cebar os biorreactores de cultivo. Con este obxectivo fixéronse 12 subcultivos de *P.patens* WT e 12 subcultivos de *P.patens* AW en matraces Erlenmeyer 500 mL ó longo de 10 meses. As diferencias nos subcultivos descríbense a continuación.

### 3.2.3. Cultivo de *P.patens* en biorreactores

Realizouse o autoclavado (Raypa 80L, Barcelona Spain) do biorreactor (Applikon BioBundle, Schiedam, The Netherlands) de 12 L de capacidade estando este baleiro, de seguido volveuse a autoclavar selado desta volta con 2 litros de medio Knop. Empregáronse os subcultivos de *P.patens* descritos na sección 2.2.2. que se someteron a disgregación mecánica mediante Polytron (Montreal, Canada) do xeito descrito na sección 2.2.1. O brión disgregado inoculouse en botellas de 1 L de volume completadas con medio de cultivo Knop. A algúns dos cultivos engadiuselle Tartrato de amonio ( $460 \text{ mg L}^{-1}$ ) e nitrato de amonio ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ). A continuación inocularonse nos biorreactores. Realizáronse controis de esterilidade. As condicións do biorreactor son unha temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ , 100 rpm de axitación, e fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuridade, cunha intensidade luminosa  $210 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con tubos LED, aireación  $0.3 \text{ vvm}$  [(volume aireación)/(volume de medio)/min] e pH libre.

## 3.3. Experimento de carga de HAPs nos clons de *P. patens*

### 3.3.1. Preparación dos clons de *P.patens*

Unha vez extraéronse os brións do biorreactor, procedeuse ao secado a  $25^{\circ}\text{C}$ . A continuación realízase o homoxeneizado de *P.patens* mediante unha licuadora (Waring Blender Laboratory Blender, Waring comercial, New Hartford, Connecticut, USA) a 470 rpm, 5 segundos.

Acto seguido, procedeuse á desvitalización dos brións mediante choque térmico cunha rampa de temperaturas estando 8 h a cada unha das seguintes: 40 °C, 80 °C e 100 °C, na estufa (P-Selecta Dry-big, Selecta, Barcelona, España). Unha vez desvitalizados e atemperados a 25°C, realizouse a moenda dos brións nun muíño tanxencial de bólas (Restch MM400, Haan, Germany), empregando cápsulas de ZrO<sub>2</sub> e acadando as partículas obtidas un diámetro de 10 µm.

### 3.3.2. *Carga de HAPs*

As incubacións de cada un dos clons (WT e AW) realízanse nun control e en 5 disolucións dun patrón de HAPs (Polynuclear Aromatic Hydrocarbon 16 solution ). As concentracións de cada un dos HAPs no patrón son 10 µg/mL e as disolucións probadas móstranse na táboa 1.

Nun matras Erlenmeyer de 100 mL engadiuse 1 g de brión moído e pesado nunha báscula de precisión (Mettler AJ100, Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland). A continuación engadiuse cada unha das disolucións da táboa 1 e homoxenizouse durante 1 h a 120 rpm estando cuberto con parafilm®. A continuación filtrouse nun funil Büchner acoplado a un kitasato e unha bomba de baleiro. Empregouse un filtro de nitrocelulosa de 0,45 µm (Milipore .45 µm 90 mm nitrocellulose, Darmstadt, Alemania), xa que o intento de emprego de filtros de nylon de 0,45 µm (Milipore .45 µm, 90 mm, nylon, Darmstadt, Alemania ) fracasou. Finalmente, empregando un portaobxectos, separase o brión húmido do filtro e déixase secar a temperatura ambiente (25°C), moéndose posteriormente nun muíño tanxencial de bólas (Restch MM400, Haan, Germany), empregando cápsulas de ZrO<sub>2</sub>.

### 3.3.3. *Determinacións dos HAPs*

As determinacións realizáronse no Instituto de Medio Ambiente (Universidade da Coruña).

Os HAPs contidos nos brións analizáronse mediante extracción en matriz de dispersión en fase sólida, seguido de determinación mediante unha vaporización de temperatura programada, cromatografía de gases e espectrometría de masas en tándem (PTV-GC-MS / MS) empregando metodoloxía desenvolvida por (Concha-Graña *et al.* , 2015).

## 4. Resultados e discusión

### 4.1 Resultados de cultivo en matraces para *P.patens* WT

O obxectivo é conseguir un volume elevado do brión *Physcomitrella patens* no menor tempo posible para cebar os biorreactores, acadando a maior eficacia en relación ao esforzo no laboratorio.

O método de disgregación mecánica con menor porcentaxe de contaminación nos subcultivos é o Polytron (sección 3.2.1.a). Os resultados para o método de subcultivo empregado en ámbolos dous clons, *P.patens* WT e *P.patens* AW, indican que un cultivo directo en matraces Erlenmeyer 500 mL cebado con gametóforos disgregados reducen o tempo de cultivo en comparación cun cultivo indirecto en matraces de 50 ou 100 mL primeiro, para despois transvasar a un matraz de 500 mL. Ademais de que o cultivo directo, ten un risco menor de contaminación xa que só precisa que se realice unha vez o protocolo de disgregación mecánica.

É necesario ter en conta as seguintes variables: volume de inóculo nos matraces de 500 mL, composición do medio de cultivo e tempo (días), que pasan os brións nos matraces dende a súa inoculación. Os resultados dos 12 subcultivos que se fixeron refléxanse na táboa 2.

Para *P.patens* WT o volume de inóculo mínimo de 10-20 mL é necesario para acadar unha media de 22 días de tempo de cultivo unicamente con medio Knop. Obsérvase que engadir nitrato de amonio reduce a 20 días o tempo de cultivo. Porén, o subcultivos 7 e 8 posúen unha media tamén de 20 días sen este engadido (táboa 2). O nitrato de amonio como complemento nutritivo para o medio non supón, por tanto, unha redución significativa no tempo de cultivo nos subcultivos de matraces para *P.patens* WT.

Para *P.patens* AW non podemos sacar conclusión claras sobre o volume de inóculo xa que o subcultivo 3 duplica ao 4 en número de días co mesmo volume de inóculo (táboa 2). Porén, si podemos sacar conclusión en canto ao composición do medio. O tartrato de amonio reduce á metade o tempo de cultivo comparada ca media de 22,6 días dos subcultivos só con medio Knop. O nitrato de amonio tamén reduce o tempo de cultivo a 19,5 días (táboa 2). É importante destacar

que se comeza a empregar nitrato de amonio en AW porque presentan un aspecto máis verdoso que só con medio Knop.

Na comparativa dos subcultivos de *P.patens* WT e *P.patens* AW a media xeral de tempo de cultivo é 21,6 días para o primeiro e de 20,6 días para o segundo. Difiren só nun día, é máis, si se elimina o subcultivo 8 con tartrato de amonio de AW a media de *P.patens* AW redúcese a 21,45 días (táboa 2).

Polo tanto non se aprecian diferencias nos tempos de cultivos entre *P.patens* WT e *P.patens* AW cas variacións de inóculo e de medio de cultivo aportadas neste traballo. .

#### 4.2 Resultados cultivo en Biorreactores

Si calculamos os g/día de brión *P.patens* WT atopamos un rendemento de 1,06 g/día cando engadimos tartrato de amonio e baixamos a axitación a 50 rpm. Pero cando, a maiores disto, engadimos nitrato de amonio acádase un rendemento de 1,32 g/día (táboa 3).

Porén, en *P.patens* AW atopamos que non é suficiente con engadir tartrato de amonio, é preciso sumarlle o nitrato de amonio e baixar a axitación a 50 rpm para acadar un rendemento de 1 gr/día.. Inda así, obsérvase que o clon AW é menos produtivo con respecto a WT nas mesmas condición (táboa 3).

#### 4.3 Resultados na filtración de HAPs con *P.patens*

No proceso de filtrado descrito na sección 3.3.2 a masa inicial do brión foi de 1 g para tódolos casos. Logo da filtración hai unha perda de masa de aproximadamente o 40 % (táboa 1). Os restos de brión que quedan no matraz logo da incubación, así como os restos impregnados no filtro de nitrocelulosa poden ser as causas de dito descenso na masa de *P.patens*.

#### 4.4 Resultados de determinación dos HAPs en *P.patens*

A proba realizada para medir a concentración de HAPs nas diferentes disolucións de *P.patens* (PTV-GC-MS / MS) refléxanse na táboa 4. Porén, son uns resultados que non poden ser considerados na súa totalidade. As concentracións de HAPs elixidas para realizar as disolucións

con *P.patens* foron demasiado altas, producindo saturación da sinal e efecto de arrastre nas lecturas. Polo tanto, só se teñen en conta os datos cualitativos para as disolucións con 0,12 mL de concentración de HAPs, é dicir, *P.patens* WT 2 e *P.patens* AW 2.

Si se restan aos datos de AW2 e WT2 as concentracións de AW1 e WT1, sendo estes o control e por tanto a cantidade natural de HAPs presentes nos brión, obtéñense as concentración dos HAPs captados polos brións e pódense observar as diferenzas entre o *P.patens* AW e *P.patens* WT (figura 1). En *P.patens* WT hai maior concentración de acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benz[a]antraceno, criseno, dibenz[a,h]antraceno, inden[1,2,3-cd]pireno e benzo[ghi]perilileno con respecto a *P.patens* AW. Salvo no benzo[b+j]fluoranteno e benzo[a]pireno nos que a concentración en *P.patens* AW é aproximadamente de 300 µg/g comparado con *P.patens* WT (figura 1). No benzo(k)fluoranteno as concentracións son similares. Estes tres HAPs que teñen a mesma fórmula C<sub>20</sub>H<sub>12</sub> contando con 5 aneis de benceno pero que varían na estrutura (Kim *et al.* , 2013), son os que mostran diferentes resultados con respecto ó resto. Por último o naftaleno amosa unha concentración nos dous clons moi baixa con respecto o resto de HAPs, este resultado pode deberse á súa volatilidade no proceso de preparación das mostras en laboratorio.

Estos resultados son prometedores para comprobar a hipótese proxectada de que a lipofilicidade dos ácidos grasos que forman as ceras cuticulares do brión son chave para captar hidrocarburos policíclicos aromáticos. É convinte repetir a proba de carga dos HAPs con disolucións de menor concentración de HAPs para evitar os problemas de saturación de sinal no aparato de medida ca fin de obter uns resultados máis amplos que apoiem a hipótese.

A maiores, é necesaria unha proba de exposición dos hidrocarburos policíclicos aromáticos N, naftaleno; Acei, acenaftileno; Ace, acenafteno; F, fluoreno; Fe, fenantreno; Ant, antraceno; Fl, fluoranteno; P: pireno; BaAnt: benzo[a]antraceno; Cr: criseno; BbjFl: benzo[b+j]fluoranteno; BkFl: benzo[k]fluoranteno; BePir:benzo[e]pireno; BaPir: benzo[a]pireno; DBahAnt: dibenzo[a,h]antraceno; Ipir: inden[1,2,3-cd]pireno; BghiPer: benzo[ghi]perilileno en campo para testar a eficacia de *Physcomitrella patens* WT respecto a

*Physcomitrella patens* AW na captación dos mesmos. Toda a produción do brión *Physcomitrella patens* foi almacenada no Departamento de Bioloxía Funcional, Ecoloxía da Universidade de Santiago de Compostela e empregárase para montar os dispositivos de biomonitorización pasivos, mosspheres, en futuros traballos.

É importante facer fincapé na mellora que pode acadar a biomonitorización de contaminantes neste eido. As vantaxes que posúen os dispositivos de mostraxe pasivos como as mosspheres son importantes con respecto aos dispositivos tradicionais empregados. Por exemplo: aumento da superficie específica de captación, diminución a cero na enerxía empregada para a captación de contaminantes e redución dos costes económicos de produción e instalación. Os cales aumentan as posibilidades de establecer máis estacións de mostraxe, creando un mapa de contaminación máis preciso.

## 5. Conclusión

O aumento xeneralizado no uso de combustibles fósiles como fontes de enerxía dende principios do século XX provocou que a concentración de contaminantes atmosféricos aumentara de xeito alarmante. Os hidrocarburos policíclicos aromáticos teñen consecuencias directas na saúde das persoas, dende enfermidades respiratorias ata cancros. Derivados da actividade xenotóxica (directa sobre o ADN) e non xenotóxica (indirecta) de algúns HAPs como o benzo(a)pireno. A monitorización da calidade do aire debe chegar a ser, polo tanto, unha prioridade das administracións para tomar medidas de diminución de emisión de estes compostos. As características fisiolóxicas e as propiedades lipófilas da cutícula de *Physcomitrella patens* poden converterse nunha estratexia para acadar este fin segundo os resultados de este traballo. Da mesma maneira os resultados na optimización do cultivo de *Physcomitrella patens* en biorreactores de volume medio (12 L), e sobre todo as diferencias no cultivo que se poñen en evidencia entre *P.patens* WT e *P.patens* AW son totalmente pioneiros. Un experimento de exposición a HAPs en laboratorio para *P.patens* WT e *P.patens* AW que teña en conta os resultados aquí mostrados confirmará como de eficaz pode chegar a ser a cutícula de este brión para captar hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Táboa 1: Concentracións de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP's) disoltos en auga mili Q. expresadas en µg/ml. A concentración inicial para todos os HAP's é de 10 µg/ml. O volume final da disolución é de 25 mL en todos os casos. Masa de *Physcomitrella patens* WT e *Physcomitrella patens* AW trala filtración na disolución con HAP's.

Disolucións (µg/mL)	AW 1	AW 2	AW 3	AW 4	AW 5	AW 6	WT 1	WT 2	WT 3	WT 4	WT 5	WT 6
N	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064
Acei	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064
Ace	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064
F	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064
Fe	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064
Ant	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064
Fl	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064
Pir	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064
BaAnt	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064
Cr	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064
BbjFl	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064
BkFl	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064
BaPir	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064
DBahAnt	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064
Ipir	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064
BghiPer	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064	0,000	0,048	0,100	0,202	0,612	1,064
Total HAP's (mL)	0,000	0,120	0,250	0,500	1,500	2,500	0,000	0,120	0,250	0,500	1,500	2,500
H <sub>2</sub> O mili Q (mL)	25,000	24,880	24,750	24,500	23,500	22,500	25,000	24,880	24,750	24,500	23,500	22,500
M (g)	0,580	0,610	0,590	0,590	0,580	0,580	0,550	0,570	0,590	0,580	0,570	0,570

Abreviaturas: AW: "absence of wax" ; WT: "wild type". N, naftaleno; Acei, acenaftileno; Ace, acenafteno; F, fluoreno; Fe, fenantreno; Ant, antraceno; Fl, fluoranteno; P: pireno; BaAnt: benzo[a]antraceno; Cr: criseno; BbjFl: benzo[b+j]fluoranteno; BkFl: benzo[k]fluoranteno; BePir: benzo[e]pireno; BaPir: benzo[a]pireno; DBahAnt: dibenzo[a,h]antraceno; Ipir: inden[1,2,3-cd]pireno; BghiPer: benzo[ghi]perileno.

Táboa 2: Relación das diferenzas nas condicións de cultivo entre os 12 subcultivos consecutivos para *Physcomitrella patens* WT e *Physcomitrella patens* AW así como os días de duración dos mesmos. Realizáronse en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 200 ml de medio de cultivo.

<i>Physcomitrella patens</i> WT					<i>Physcomitrella patens</i> AW				
Subcultivos	V. de inóculo (mL)	Medio de cultivo Knop	T(días)	$\mu$ WT (días)	Subcultivos	V. de inóculo (mL)	Medio de cultivo Knop	T(días)	$\mu$ AW (días)
1	50	-	18		1	50	-	24	
2	30	-	21		2	15	-	19	
3	50	-	23		3	7,5	-	16	
4	1,5	-	33		4	7,5	-	27	
5	7,5	-	28		5	7,5	-	30	
6	10	-	15		6	12,5	-	18	
7	20	-	21		7	50	-	24	22,57
8	20	-	19	22,25	8	20	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	11	
9	20	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	21		9	20	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16	
10	20	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	22		10	20	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	22	
11	20	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	19		11	20	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20	
12	20	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	19	20,25	12	30	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20	19,5
Total	-	-	-	21,58	Total	-	-	-	21,45

Abreviaturas: AW, "absence of wax"; WT, "wild type". Nitrato de amonio, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; Tartrato de amonio, C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>.

Táboa 3: Relación das diferenzas nas condicións de cultivo de *Physcomitrella patens* WT e *Physcomitrella patens* AW en biorreactores (12 L).

<i>Physcomitrella patens</i> WT							
Biorreactores	Medio de cultivo Knop	V (L)	Axitación (rpm)	T (días)	M brión seco (g)	M brión seco/T	
1	-	12*	100	27	12	0,44	
2	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	12	100	27	19	0,70	
3	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	12	100	22	11	0,50	
4	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	12	100	19	13	0,68	
5	-	12	200	19	11	0,58	
6	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	12	50	25	26	1,04	
7	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> ; NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	12	50	17	18	1,06	
8	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> ; NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	12	50	19	25	1,32	
$\mu$	-	-	-	21,87	16,87	0,79	

<i>Physcomitrella patens</i> AW							
Biorreactores	Medio de cultivo Knop	V (L)	Axitación (rpm)	T (días)	M brión seco (g)	M brión seco/T	
1	-	8*	100	41	20,3	0,50	
2	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	12*	100	27	12	0,44	
3	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	12	100	25	12	0,48	
4	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> ; NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	12	50	21	21	1	
$\mu$				28,5	16,32	0,60	

\*: Nos 3 casos engádense os 4 últimos litros de volume despois dos 15 primeiros días.

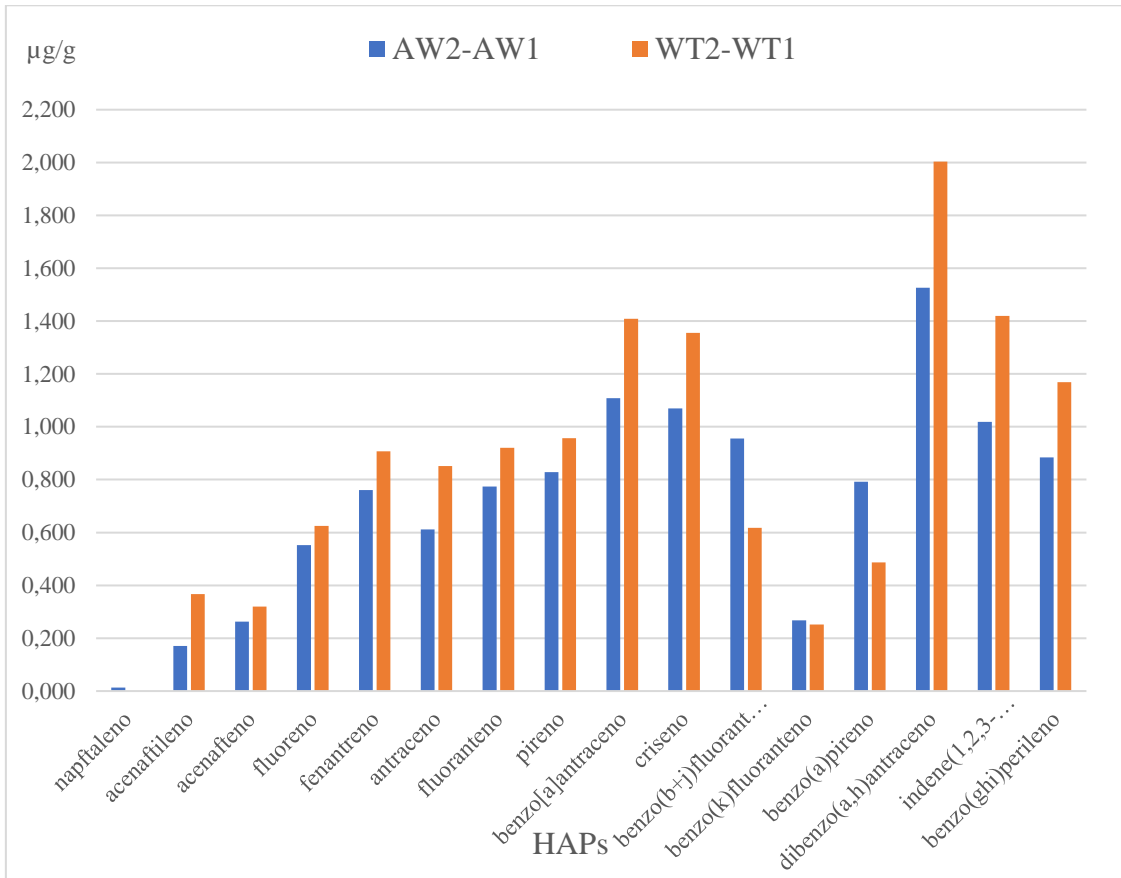
Abreviaturas: AW, "absence of wax"; WT, "wild type". Tartrato de amonio, C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>; Nitrato de amonio NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

Táboa 4: Concentracións de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs) captados por *Physcomitrella patens*, WT e *Physcomitrella patens* AW expresado en µg/g nas 12 disolucións descritas na táboa 1. A determinación dos HAPs realizouse mediante PTV-GC-MS /MS.

µg/g	AW1	AW2	AW3	AW4	AW5	AW6	WT1	WT2	WT3	WT4	WT5	WT6
N	0,049	0,062	0,060	0,058	0,064	0,070	0,099	0,074	0,319	0,381	1,061	2,078
Acei	0,000	0,171	0,241	0,833	1,447	1,810	0,000	0,367	1,052	1,802	2,792	3,486
Ace	0,013	0,276	0,275	0,852	0,964	1,311	0,011	0,331	0,578	1,080	2,018	2,700
F	0,012	0,564	0,780	2,435	2,720	3,902	0,016	0,641	1,360	2,263	4,202	5,524
Fe	0,021	0,781	1,349	3,195	8,117	10,058	0,030	0,936	2,014	3,840	9,738	12,925
Ant	0,010	0,621	1,199	2,633	6,598	9,554	0,008	0,859	1,922	3,460	8,725	12,126
Fl	0,008	0,782	0,658	1,532	6,632	8,479	0,015	0,936	1,368	1,702	7,838	10,024
P	0,007	0,835	0,736	2,580	5,495	10,389	0,013	0,970	0,945	1,835	7,407	11,571
BaAnt	0,001	1,110	0,612	2,107	5,528	12,669	0,009	1,418	0,665	1,122	2,653	3,090
Cr	0,000	1,070	0,793	2,154	9,445	15,493	0,008	1,364	1,547	3,317	7,409	28,514
BbjFl	0,001	0,957	0,793	0,137	0,945	0,686	0,006	0,624	0,369	0,412	0,150	0,473
BkFl	0,000	0,268	0,188	0,569	3,400	1,032	0,005	0,257	0,647	1,435	1,562	5,104
BaPir	0,001	0,793	0,346	1,207	1,780	0,771	0,004	0,491	0,657	1,643	1,086	0,889
DBahAnt	0,000	1,526	0,328	0,782	0,940	6,059	0,001	2,004	0,680	1,067	1,612	3,479
Ipir	0,000	1,019	0,247	0,520	0,894	2,081	0,001	1,421	0,814	1,821	0,914	1,012
BghiPer	0,001	0,886	0,676	1,836	9,096	6,008	0,004	1,173	1,115	4,796	6,614	2,028

Abreviaturas: AW, “absence of wax” ; WT, “wild type”. N, naftaleno; Acei, acenaftileno; Ace, acenafteno; F, fluoreno; Fe, fenantreno; Ant, antraceno; Fl, fluoranteno; P: pireno; BaAnt: benzo[a]antraceno; Cr: criseno; BbjFl: benzo[b+j]fluoranteno; BkFl: benzo[k]fluoranteno; BaPir: benzo[a]pireno; DBahAnt: dibenzo[a,h]antraceno; Ipir: inden[1,2,3-cd]pireno; BghiPer: benzo[ghi]perileno. PTV-GC-MS / MS : extracción en matriz de dispersión en fase sólida, determinación mediante vaporización de temperatura programada, cromatografía de gases e espectrometría de masas en tándem.

Figura 1: Concentración de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs) captados por *Physcomitrella patens*, WT e *Physcomitrella patens* AW expresado en  $\mu\text{g/g}$ . As concentración de *P.patens* AW2 e *P.patens* WT2 réstanselle os valores obtidos para *P.patens* AW1 e *P.patens* WT1 respectivamente.



Abreviaturas: AW, "absence of wax"; WT, "wild type".

## 6. Bibliografía

- Aboal, J.R., Concha-Graña, E., De Nicola, F., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Giordano, S., Capozzi, F., Di Palma, A., Reski, R., Zechmeister, H., Martínez-Abaigar, J., Fernández, J.A., 2020. Testing a novel biotechnological passive sampler for monitoring atmospheric PAH pollution. *Journal of Hazardous Materials* 381, 120949. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120949>
- Ares, A., Aboal, J.R., Carballeira, A., Giordano, S., Adamo, P., Fernández, J.A., 2012. Moss bag biomonitoring: A methodological review. *Science of The Total Environment* 432, 143–158. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.087>
- Ares, Á., Ángel Fernández, J., Ramón Aboal, J., Carballeira, A., 2011. Study of the air quality in industrial areas of Santa Cruz de Tenerife (Spain) by active biomonitoring with *Pseudoscleropodium purum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 533–541. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.019>
- Buda, G.J., Barnes, W.J., Fich, E.A., Park, S., Yeats, T.H., Zhao, L., Domozych, D.S., Rose, J.K.C., 2013. An ATP Binding Cassette Transporter Is Required for Cuticular Wax Deposition and Desiccation Tolerance in the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 25, 4000–4013. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117648>
- Capozzi, F., Giordano, S., Di Palma, A., Spagnuolo, V., De Nicola, F., Adamo, P., 2016. Biomonitoring of atmospheric pollution by moss bags: Discriminating urban-rural structure in a fragmented landscape. *Chemosphere* 149, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.065>
- Cohen, A.J., Samet, J.M., Straif, K., International Agency for Research on Cancer, 2013. Air pollution and cancer. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Concha-Graña, E., Muniategui-Lorenzo, S., De Nicola, F., Aboal, J.R., Rey-Asensio, A.I., Giordano, S., Reski, R., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., 2015. Matrix solid phase dispersion method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in moss. *Journal of Chromatography A* 1406, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.06.014>
- Dat, N.-D., Chang, M.B., 2017. Review on characteristics of PAHs in atmosphere, anthropogenic sources and control technologies. *Science of The Total Environment* 609, 682–693. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.204>
- De Nicola, Flavia, Murena, F., Costagliola, M.A., Alfani, A., Baldantoni, D., Prati, M.V., Sessa, L., Spagnuolo, V., Giordano, S., 2013. A multi-approach monitoring of particulate matter, metals and PAHs in an urban street canyon. *Environ Sci Pollut Res* 20, 4969–4979. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1456-1>
- De Nicola, F., Spagnuolo, V., Baldantoni, D., Sessa, L., Alfani, A., Bargagli, R., Monaci, F., Terracciano, S., Giordano, S., 2013. Improved biomonitoring of airborne contaminants by combined use of holm oak leaves and epiphytic moss. *Chemosphere* 92, 1224–1230. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.050>
- Foan, L., Domercq, M., Bermejo, R., Santamaría, J.M., Simon, V., 2015. Mosses as an integrating tool for monitoring PAH atmospheric deposition: Comparison with total deposition and evaluation of bioconcentration factors. A year-long case-study. *Chemosphere* 119, 452–458. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.071>
- Foan, L., Leblond, S., Thöni, L., Raynaud, C., Santamaría, J.M., Sebilo, M., Simon, V., 2014. Spatial distribution of PAH concentrations and stable isotope signatures ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) in mosses from three European areas – Characterization by multivariate analysis. *Environmental Pollution* 184, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.08.006>
- Harmens, H., Foan, L., Simon, V., Mills, G., 2013. Terrestrial mosses as biomonitors of atmospheric POPs pollution: A review. *Environmental Pollution* 173, 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.10.005>
- Hohe, A., Reski, R., 2005. Control of growth and differentiation of bioreactor cultures of *Physcomitrella* by environmental parameters, in: Hvoslef-Eide, A.K., Preil, W. (Eds.), *Liquid Culture Systems for in Vitro Plant Propagation*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 155–161. [https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5\\_10](https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_10)

- Kasala, E.R., Bodduluru, L.N., Barua, C.C., Sriram, C.S., Gogoi, R., 2015. Benzo(a)pyrene induced lung cancer: Role of dietary phytochemicals in chemoprevention. *Pharmacological Reports* 67, 996–1009. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.03.004>
- Kim, K.-H., Jahan, S.A., Kabir, E., Brown, R.J.C., 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International* 60, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019>
- López Mahía, P., 2016. Material particulado atmosférico: el desafío de una mezcla compleja de contaminantes: discurso de ingreso como Académica correspondiente, Purificación López Mahía, discurso de presentación, Soledad Muriategui Lorenzo. NINO, Santiago de Compostela.
- Ravindra, K., Sokhi, R., Vangrieken, R., 2008. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment* 42, 2895–2921. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.010>
- Renault, H., Alber, A., Horst, N.A., Basilio Lopes, A., Fich, E.A., Kriegshauser, L., Wiedemann, G., Ullmann, P., Herrgott, L., Erhardt, M., Pineau, E., Ehlting, J., Schmitt, M., Rose, J.K.C., Reski, R., Werck-Reichhart, D., 2017. A phenol-enriched cuticle is ancestral to lignin evolution in land plants. *Nat Commun* 8, 14713. <https://doi.org/10.1038/ncomms14713>
- Rengarajan, T., Rajendran, Peramaiyan, Nandakumar, N., Lokeshkumar, B., Rajendran, Palaniswami, Nishigaki, I., 2015. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 5, 182–189. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(15\)30003-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(15)30003-4)
- Reski, R., Abel, W.O., 1985. Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* 165, 354–358. <https://doi.org/10.1007/BF00392232>
- Vingiani, S., De Nicola, F., Purvis, W.O., Concha-Graña, E., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Giordano, S., Adamo, P., 2015. Active Biomonitoring of Heavy Metals and PAHs with Mosses and Lichens: a Case Study in the Cities of Naples and London. *Water Air Soil Pollut* 226, 240. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2504-5>
- Wu, Q., Wang, X., Zhou, Q., 2014. Biomonitoring persistent organic pollutants in the atmosphere with mosses: Performance and application. *Environment International* 66, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.12.021>