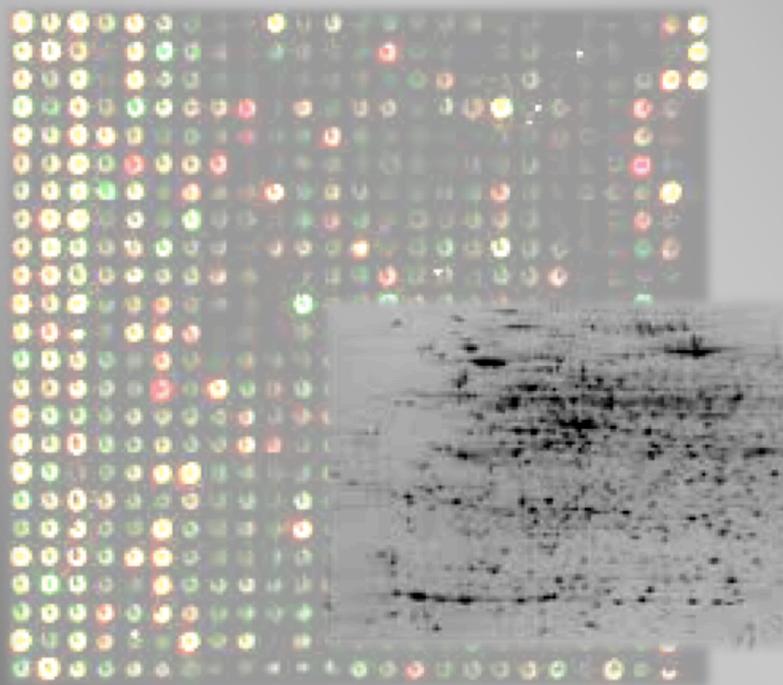




Análisis transcriptómico y proteómico de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 en respuesta a cianuro

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Córdoba



María de la Paz Escribano Fernández

Córdoba, 2016

TITULO: *Análisis transcriptómico y proteómico de Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344 en respuesta a cianuro*

AUTOR: *María de la Paz Escribano Fernández*

© Edita: UCOPress. 2016
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



Universidad de Córdoba

Facultad de Ciencias

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**Análisis transcriptómico y proteómico de
Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344 en
respuesta a cianuro**

Tesis Doctoral

María de la Paz Escribano Fernández

Córdoba, 2016



TÍTULO DE LA TESIS: Análisis transcriptómico y proteómico de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 en respuesta a cianuro

DOCTORANDO/A: María de la Paz Escribano Fernández

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La doctoranda M^a de la Paz Escribano Fernández comenzó su tesis doctoral en 2004, incorporándose al grupo de investigación CVI-117 del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba. Comenzó su etapa predoctoral iniciándose en diferentes técnicas bioquímicas y trabajando con la bacteria objeto de este estudio, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Debido a que la doctoranda ha estado trabajando como profesora de Enseñanza Secundaria durante el desarrollo de su Tesis Doctoral, el tiempo requerido para finalizar este trabajo ha sido superior que al previsto en condiciones normales. A pesar de esto, la doctoranda ha manejado un amplio y variado número de técnicas bioquímicas, moleculares y microbiológicas, y ha adquirido una alta formación y cualificación. Ha realizado importantes estudios transcriptómicos y proteómicos, y ha generado y caracterizado estirpes mutantes de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 afectadas en el proceso de degradación de cianuro. Los resultados obtenidos han cumplido satisfactoriamente los objetivos planteados inicialmente en este trabajo, adquiriendo una gran cantidad de información del metabolismo del cianuro, tanto a nivel transcriptómico como proteómico, lo que permitirá continuar en el futuro con nuevos estudios.

Hasta la fecha, la doctoranda cuenta con 4 publicaciones en revistas JCR de alto índice de impacto en el área, 4 capítulos de libro, y 20 comunicaciones a congresos, tanto

nacionales como internacionales. Las publicaciones científicas obtenidas a partir de este trabajo, así como las comunicaciones presentadas en congresos, se exponen a continuación:

Publicaciones:

1. Luque-Almagro VM*, **Escribano MP***, Manso I, Sáez LP, Cabello P, Moreno-Vivián C, Roldán MD (2015). DNA microarray analysis of the cyanotroph *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in response to nitrogen starvation, cyanide and a jewelry wastewater. *J Biotechnol*, 214:171-181 (*Primera autoría compartida).
2. Wibberg D, Luque-Almagro VM, Igeño MI, Bremges A, Roldán MD, Merchán F, Sáez LP, Guijo MI, Manso MI, Macías D, Cabello P, Becerra G, Ibáñez MI, Carmona MI, **Escribano MP**, Castillo F, Sczyrba A, Moreno-Vivián C, Blasco R, Pühler A, Schlüter A (2014). Complete genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *J Biotechnol*, 175:67-68.
3. Luque-Almagro VM, Acera F, Igeño MI, Wibberg D, Roldán MD, Sáez LP, Hennig M, Quesada A, Huertas MJ, Blom J, Merchán F, **Escribano MP**, Jaenicke S, Estepa J, Guijo MI, Martínez-Luque M, Macías D, Szczepanowski R, Becerra G, Ramírez S, Carmona MI, Gutiérrez O, Manso-Cobos I, Pühler A, Castillo F, Moreno-Vivián C, Schlüter A, Blasco R (2013). Draft whole genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Environ Microbiol*, 15:253-270.
4. Estepa J, Luque-Almagro VM, Manso I, **Escribano MP**, Martínez-Luque M, Castillo F, Moreno-Vivián C, Roldán MD (2012). The *nit1C* gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 involved in assimilation of nitriles is essential for growth on cyanide. *Environ Microbiol Rep*, 4:326-334.

Capítulos de libro:

1. Roldán MD, Luque-Almagro VM, Sáez LP, Manso I, Pérez-Reinado E, Huertas MJ, **Escribano MP**, Gutiérrez O, Estepa J, Gates AJ, Richardson DJ, Martínez-Luque M,

Moreno-Vivián C, Castillo F (2012). Degradación de contaminantes medioambientales nitrogenados por bacterias. Aplicaciones biotecnológicas. En *Avances en el metabolismo del nitrógeno. Evolución e integración de las rutas del metabolismo nitrogenado en el equilibrio biogeoquímico*. Editorial: Copisterías Don Folio S.L., Córdoba (España). Pp: 273-289. ISBN: 978-84-15105-52-7.

2. Castillo Rodríguez F, Roldán Ruiz MD, Luque-Almagro VM, Sáez Melero LP, Ibáñez García MI, Caballero Domínguez FJ, **Escribano Fernández MP**, Blanco Moreno R, Manso Cobos IM, Moreno-Vivián C (2012). Biodegradación de residuos industriales cianurados por la bacteria alcalófila *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. En *V Jornadas de divulgación de la investigación en biología molecular, celular, genética y biotecnología*. Editorial: Ámbito Gráfico S.L.L., Córdoba (España). Pp: 105-110. ISBN: 978-84-940063-0-2.
3. Moreno-Vivián C, Luque-Almagro VM, Huertas MJ, Sáez LP, **Escribano MP**, Martínez-Luque M, Blasco R, Roldán MD, Castillo F (2009). Cianotrofia: biodegradación y asimilación del cianuro y sus derivados por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. En *Avances en el metabolismo del nitrógeno. De la genómica y la proteómica a las aplicaciones agronómicas, industriales y medioambientales*. Editorial: Editorial Club Universitario, Alicante (España). Pp: 279-285. ISBN: 978-84-8454-806-5.
4. Huertas MJ, Luque-Almagro VM, **Escribano MP**, Martínez-Luque M, García I, Blasco R, Moreno-Vivián C, Roldán MD, Castillo F (2009). Estudio proteómico y aplicaciones biotecnológicas de la biodegradación de cianuro por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. En *Avances en el metabolismo del nitrógeno. De la genómica y la proteómica a las aplicaciones agronómicas, industriales y medioambientales*. Editorial: Editorial Club Universitario, Alicante (España). Pp: 301-307. ISBN: 978-84-8454-806-5

Congresos:

1. Luque-Almagro VM, **Escribano MP**, Manso I, Cabello P, Moreno-Vivián C, Roldán MD.

Título: Análisis transcriptómico de la bacteria cianotrofa *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 en respuesta a cianuro.

Tipo de participación: comunicación oral

Congreso: XIII Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno

Lugar de celebración: Villanueva de la Serena (España)

Fecha: 4 - 6 febrero 2016

2. Luque-Almagro VM, **Escribano MP**, Cabello P, Manso I, Sáez LP, Moreno-Vivián C, Roldán MD.

Título: Iron homeostasis and oxidative stress in bacterial cyanide assimilation

Tipo de participación: comunicación oral

Congreso: Annual Congress of Biotechnology (SciBAC 2015)

Lugar de celebración: Salamanca (España)

Fecha: 8 - 10 julio 2015

3. Autores: Moreno-Vivián C, Luque-Almagro VM, Manso I, Ibáñez I, Sáez LP, **Escribano MP**, Cabello P, Castillo F, Roldán MD

Título: Análisis global de la degradación de residuos cianurados industriales por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

Tipo de participación: Póster

Congreso: XXXVII Congreso SEBBM

Lugar de celebración: Granada (España)

Fecha: 9-12 septiembre 2014

4. Luque-Almagro VM, Manso I, Sáez LP, Ibáñez I, **Escribano MP**, Moreno-Vivián C, Roldán MD

Título: Global analysis of the response to cyanide by the cyanotroph *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

Tipo de participación: comunicación oral

Congreso: 19th European Nitrogen Cycle Meeting

Lugar de celebración: Ghent (Bélgica)

Fecha: 10 - 12 septiembre 2014

5. Autores: **Escribano MP**, Cabello P, Luque-Almagro VM, Rodríguez Caballero G, Castillo F, Roldán MD, Moreno-Vivián C.

Título: Efecto de metales sobre la asimilación de cianuro en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

Tipo de participación: Póster

Congreso: XII Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno

Lugar de celebración: Bilbao (España)

Fecha: 7-9 julio 2014

6. **Escribano MP**, Manso I, Luque-Almagro VM, Ibáñez MI, Sáez LP, Cabello P, Castillo F, Moreno-Vivián C, Roldán MD
Título: Biotechnological aspects of cyanide degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344
Tipo de participación: Comunicación oral
Congreso: Biotec 2014 (Sociedad Española de Biotecnología)
Lugar de celebración: Madrid (España)
Fecha: 01 - 04 de julio de 2014
7. Autores: Moreno-Vivián C, Sáez LP, Manso I, Ibáñez I, **Escribano MP**, Rodríguez Caballero G, Cabello P, Castillo F, Luque-Almagro VM, Roldán MD.
Título: Biodegradación de residuos industriales con cianuro
Tipo de participación: Póster
Congreso: XXXVI Congreso SEBBM
Lugar de celebración: Madrid (España)
Fecha: 4-6 septiembre 2013
8. Autores: Luque-Almagro, V.M.; Manso, I.; Estepa, J.; **Escribano, M.P.**; Castillo, F.; Moreno-Vivián, C.; Roldán, M.D.
Título: Role of nitriles in cyanide assimilation
Tipo de participación: comunicación oral
Congreso: 17th European Nitrogen-Cycle Meeting (ENC2012)
Lugar de celebración: Oslo (Noruega)
Fecha: 26/09/2012 - 28/09/2012
9. Autores: Luque-Almagro, V.M.; Acera, F.; Igeño, M.I.; Wibberg, D.; Roldán, M.D.; Sáez, L.P.; Hennig, M.; Quesada, A.; Huertas, M.J.; Blom, J.; Merchán, F.; **Escribano, M.P.**; Jaenicke, S.; Estepa, J.; Guijo, M.I.; Martínez-Luque, M.; Macías, D.; Szczepanowski, R.; Becerra, G.; Ramírez, S.; Carmona, M.I.; Gutiérrez, O.; Manso, I.; Pühler, A.; Castillo, F.; Moreno-Vivián, C.; Schlüter, A.; Blasco, R.
Título: Draft whole genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes*
Tipo de participación: comunicación oral
Congreso: 6th International Meeting on Biotechnology (BIOTEC2012)
Lugar de celebración: Bilbao (España)
Fecha: 19/09/2012 - 21/09/2012
10. Autores: Luque-Almagro, V.M.; Manso, I.; Estepa, J.; **Escribano, M.P.**; Sáez, L.P.; Ibáñez, I.; Moreno-Vivián, C.; Roldán, M.D.; Castillo, F
Título: Biochemistry and biotechnology of cyanide assimilation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344
Tipo de participación: Comunicación oral

Congreso: 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress
Publicación: FEBS Journal (2012). 279-s1, pp. 391-392
Lugar de celebración: Sevilla (España)
Fecha: 04/09/2012 - 09/09/2012

11. Autores: Luque-Almagro, V.M.; **Escribano, M.P.**; Manso, I.; Estepa, J.; Martínez-Luque, M.; Moreno-Vivián, C.; Roldán, M.D.; Castillo, F.
Título: Proteómica del metabolismo del cianuro en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344
Tipo de participación: Comunicación oral
Congreso: XI Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno
Lugar de celebración: Cáceres (España)
Fecha: 12/06/2012 - 14/06/2012

12. Autores: **Escribano MP**, Luque-Almagro VM, Martínez-Luque M, Moreno-Vivián C, Roldán MD, Castillo F.
Título: Función de un transportador de ácidos dicarboxílicos (C4) en la destoxificación de cianuro en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344
Tipo de participación: Póster
Congreso: X Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno
Lugar de celebración: Benalauría (Málaga)
Fecha: junio 2010

13. Autores: Blasco, R.; Luque-Almagro, V.M.; Acera, F.; Igeño, M.I.; **Escribano, M.P.**; Quesada, A.; Huertas, M.J.; Merchán, F.; Sáez, L.P.; Martínez-Luque, M.; Guijo, M.I.; Manso, I.; Becerra, G.; Estepa-Pedregosa, J.; Carmona, M.I.; Gutierrez, O.; Ramirez, M.P.; Roldán, M.D.; Moreno-Vivián, C.; Castillo, F.
Título: Genómica y Biotecnología de la biodegradación de cianuro
Tipo de participación: Comunicación oral
Congreso: XXXIII Congreso de la SEBBM
Publicación: XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (2010). pp. 64. ISBN 978-84-693-4612-9
Lugar de celebración: Córdoba (España)
Fecha: 14/09/2010 - 17/09/2010

14. Autores: **Escribano, M.P.**; Estepa-Pedregosa, J.; Luque-Almagro, V.M.; Martínez-Luque, M.; Moreno-Vivián, C.; Roldán, M.D.; Castillo, F.
Título: Efecto del cianuro sobre el proteoma de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344
Tipo de participación: Comunicación oral
Congreso: XXXIII Congreso de la SEBBM

Publicación: XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (2010). pp. 88. ISBN 978-84-693-4612-9

Lugar de celebración: Córdoba (España)

Fecha: 14/09/2010 - 17/09/2010

15. Autores: Estepa, J; Roldán, M.D.; Luque-Almagro, V.M.; **Escribano, M.P.**; Moreno-Vivián, C.; Martínez-Luque, M.; Merchán, F.; Igeño, M.I.; Blasco, R.; Castillo, F

Título: Ruta metabólica de asimilación de cianuro en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Enzimas e intermediarios

Tipo de participación: Póster

Congreso: XXXII Congreso de la SEBBM

Publicación: XXXII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR. pp. 202

Lugar de celebración: Oviedo (España)

Fecha: 23/09/2009 - 26/09/2009

16. Autores: Luque-Almagro, V.M.; Estepa, J.; **Escribano, M.P.**; Martínez-Luque, M.; Moreno-Vivián, C.; Castillo, F.; Roldán, M.D.

Título: Bacterial response to cyanide: a proteomic approach

Tipo de participación: Comunicación oral

Congreso: 14th Nitrogen Cycle Meeting

Publicación: Libro abstracts

Lugar de celebración: Alicante (España)

Fecha: 16/09/2009 - 18/09/2009

17. Autores: Luque-Almagro VM; Estepa, J.; Sáez LP; **Escribano, M.P.**; Huertas, M.J.; Martínez-Luque, M.; Roldán MD; Moreno-Vivián C; Castillo F.

Título: Metabolismo del cianato en *Pseudomonas pseudoalcaligenes*

Tipo de participación: Póster

Congreso: IV Jornadas de divulgación de la investigación en biología molecular, celular, genética y biotecnología

Publicación: IV Jornadas de Divulgación de la Investigación en Biología Molecular, Celular, Genética y Biotecnología. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba (2009) pp. 191. ISBN 978-84-7801-984-7

Lugar de celebración: Córdoba (España)

Fecha: 01/04/2009 - 02/04/2009

18. Blasco R, Luque-Almagro VM, Acera F, Schluter A, Igeño MI, **Escribano MP**, et al.

Título: Draft genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344.

Tipo de participación: comunicación oral

Congreso: Environment Workshops 2011 (Metagenomics and Environmental Microbiology)

Lugar de celebración: Baeza (España)

Fecha: 16-18 septiembre 2009

19. Huertas MJ, Luque-Almagro VM, **Escribano MP**, Martínez-Luque M, García I, Blasco R, Moreno-Vivián C, Roldán MD, Castillo F.

Título: Estudio proteómico y aplicaciones biotecnológicas de la biodegradación de cianuro por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

Tipo de participación: Comunicación oral

Congreso: IX Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno

Lugar de celebración: Alicante (España)

Fecha: 23-25 abril de 2008

20. Huertas MJ, Luque-Almagro VM, **Escribano MP**, Martínez-Luque M, García I, Blasco R, Moreno-Vivián C, Castillo F, Roldán MD

Título: Biodegradación de cianuro por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Análisis proteómico.

Tipo de participación: comunicación oral

Congreso: VIII Reunión del Metabolismo del Nitrógeno

Lugar de celebración: Lanzarote (España)

Fecha: 24-27 mayo 2006

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 29 de marzo de 2016

Firma del/de los director/es



Fdo.: M.ª Dolores Roldán Ruiz Fdo.: Víctor M. Luque Almagro

AGRADECIMIENTOS

A los directores del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, los Profesores Emilio Fernández Reyes y Conrado Moreno-Vivián, por permitirme formar parte de este gran equipo.

A mis directores de tesis, la Profesora M^a Dolores Roldán Ruíz y el Dr. Víctor Manuel Luque Almagro que me guiaron con sabiduría y paciencia durante todo este tiempo, y siempre tuvieron palabras de ánimo cuando las cosas se ponían difíciles. Sin su ayuda no hubiera podido realizar este trabajo.

Aunque ha pasado mucho tiempo, parece que fue ayer cuando tuve la conversación que cambiaría mi vida con el Profesor Manuel Martínez-Luque Romero, compañero mío por aquel entonces del Instituto de Enseñanza Secundaria Luis de Góngora. No conseguía quitarme de la cabeza mi deseo de hacer la Tesis Doctoral en Bioquímica y así se lo dije a Manuel. Enseguida me invitó a conocer el Departamento del que él formaba parte y que compartía, al igual que yo, el amor por la investigación. Fue maravilloso comenzar a trabajar con ellos. Me abrieron la puerta a un mundo donde el conocimiento se consigue con cuentagotas, tras mucho tiempo de dedicación, pero donde cada victoria compensa todo el sacrificio y te llena el alma de una alegría indescriptible. Gracias Manuel por haberlo hecho posible.

También quiero mostrar mi agradecimiento al Profesor Francisco Castillo Rodríguez por sus buenos consejos y preocupación por mi trabajo. Y al Profesor Conrado Moreno Vivián, porque siempre ha estado ahí para ayudarme a seguir la hipótesis correcta.

A mis compañeros de grupo, las Drs. Lara Sáez e Isabel Manso, a Isabel Ibáñez, a Rafael Blanco, a la Profesora Purificación Cabello y a Jessica Estepa porque me han hecho sentir como en casa. Son mi segunda familia y con ellos he compartido tantos momentos buenos que los de desánimo se hacían insignificantes. Siempre los llevaré en mi corazón.

Al Equipo Directivo de mi lugar de trabajo, el IES Alhaken II, por su apoyo y por atender siempre a mis peticiones. Y a los compañeros Ana, Luis, Ricardo, Alejandro,

Encarna y Rosa, porque estaban seguros que terminaría la tesis y esa confianza me ha ayudado a conseguirlo.

A Conchi e Inés, porque siempre me han atendido con una gran profesionalidad y cariño.

A mi familia, porque siempre me han animado a luchar por mi sueño y han soportado con paciencia tantas horas robadas de estar juntos.

Y finalmente, a mi novio Abderrahime, que comparte conmigo la pasión por conocer el mundo que nos rodea y gracias a su apoyo he podido concentrarme en el trabajo sabiendo que entendía perfectamente el tiempo que no le podía dedicar. Gracias por tu generosidad y paciencia.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL	5
1.1.1. Formas de contaminación.....	6
1.1.1.1. Según el medio físico.....	6
1.1.1.2. Según la naturaleza del contaminante	7
1.1.2. Desarrollo sostenible y legislación internacional para el control de la contaminación.....	8
1.2. LA BIORREMEDIACIÓN	9
1.2.1. Ventajas e inconvenientes de la biorremediación	9
1.2.2. Tipos de biorremediación	11
1.3. EL CIANURO	16
1.3.1. Compuestos derivados del cianuro	18
1.3.2. Complejos cianuro-metálicos	19
1.3.3. Toxicidad del cianuro	22
1.3.4. El cianuro en la naturaleza	24
1.3.5. El cianuro, un compuesto esencial en la minería y en el mundo moderno	26
1.3.6. Descontaminación de residuos industriales cianurados	28
1.3.6.1. Descomposición fotoquímica del cianuro	28
1.3.6.2. Degradación físico-química del cianuro.....	28
1.3.6.3. Degradación biológica de cianuro	30
1.4. <i>Pseudomonas</i>, UN GÉNERO CON GRAN CAPACIDAD DEGRADADORA	31
1.4.1. <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	33
1.4.2. <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT5344.....	34
1.5. HOMEOSTASIS DEL HIERRO EN BACTERIAS	35
1.6. ESTRÉS OXIDATIVO EN BACTERIAS	39
1.6.1. Efectos nocivos de las especies reactivas de oxígeno (ROS).....	40
1.6.2. Respuestas celulares y sensores de estrés oxidativo.....	42
2. OBJETIVOS	45

3. MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	47
3.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	48
3.2.1. Medios de cultivo	48
3.2.1.1. Medios líquidos	48
3.2.1.2. Medios sólidos.....	49
3.2.2. Condiciones de cultivo	49
3.3. PUREZA Y MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS	50
3.4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ACELULARES	50
3.4.1. Recolección de células.....	50
3.4.2. Preparación de extractos acelulares	50
3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS	51
3.5.1. Medida del crecimiento celular	51
3.5.2. Determinación de la concentración amonio	51
3.5.3. Determinación de la concentración cianuro libre	51
3.5.4. Determinación de la concentración α -cetoácidos totales	52
3.5.5. Determinación de la concentración de proteína.....	52
3.5.6. Determinación del hierro intracelular.....	52
3.5.7. Actividad catalasa (EC 1.11.1.6).....	53
3.6. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DEL DNA	53
3.6.1. Aislamiento del DNA	53
3.6.1.1. Aislamiento del DNA total.....	53
3.6.1.2. Extracción del DNA plasmídico	54
3.6.1.3. Cuantificación del DNA	54
3.6.1.4. Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR) ...	54
3.6.1.5. Digestión del DNA con enzimas de restricción	56
3.6.1.6. Electroforesis del DNA.....	56
3.6.1.7. Recuperación de fragmentos de DNA de los geles de agarosa.....	57
3.6.1.8. Ligación del DNA	57
3.6.2. Transformación de células de <i>E. coli</i>	57
3.6.2.1. Preparación de células competentes.....	57
3.6.2.2. Transformación de las células competentes	58

3.6.2.3. Transferencia de plásmidos por conjugación	58
3.6.3. Mutagénesis dirigida.....	58
3.6.3.1. Mutante <i>dctP1</i> ⁻ (BN5_4141).....	59
3.6.3.2. Mutante <i>dctP2Q2</i> ⁻ (BN5_1318)	59
3.6.3.3. Mutante <i>dctP1</i> ⁻ / <i>dctP2Q2</i> ⁻	60
3.6.3.4. Mutante <i>dapA</i> ⁻ (BN5_1907).....	60
3.6.3.5. Mutante <i>fhuA</i> ⁻ (BN5_0694).....	60
3.6.3.6. Mutante <i>orf3</i> ⁻ (BN5_0248).....	61
3.6.3.7. Mutante <i>ahpC</i> ⁻ (BN5_3036).....	62
3.6.4. Secuenciación del DNA	62
3.6.5. Tratamiento y análisis de secuencias.....	62
3.7. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 MEDIANTE MICROMATRICES DE DNA	63
3.7.1. Diseño de los microarrays	63
3.7.2. Cultivo de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.....	63
3.7.3. Aislamiento del ARN total.....	63
3.7.4. Retrotranscripción, marcaje del cDNA e hibridación	64
3.7.5. Análisis de los microarrays	64
3.7.6. Validación de los microarrays	65
3.8. ANÁLISIS PROTEÓMICO 2D-PAGE	66
3.8.1. Fraccionamiento subcelular	66
3.8.2. Preparación de la muestra	66
3.8.3. Isoelectroenfoque (IEF).....	67
3.8.4. Equilibrado de las tiras de IEF	68
3.8.5. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	68
3.8.6. Tinción de los geles	68
3.8.7. Adquisición de imágenes y análisis de los geles.....	69
3.8.8. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas	69
3.9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	70
3.10. REACTIVOS Y APARATOS	70
4. RESULTADOS	71

4.1. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT5344 EN RESPUESTA A CIANURO	71
4.1.1. Diseño experimental, análisis de calidad y tratamiento estadístico de las matrices de DNA	71
4.1.2. Análisis estadístico de los datos de microarray	77
4.1.3. Análisis de la expresión génica	79
4.1.4. Análisis funcional de las micromatrices de DNA.....	81
4.1.5. Algunos genes de interés afectados por limitación de nitrógeno, NaCN o residuo	87
4.1.6. Validación de los resultados obtenidos en los microarrays	91
4.2. ANÁLISIS PROTEÓMICO Y MUTACIONAL DE LA RESPUESTA A LIMITACIÓN DE HIERRO Y A CIANURO EN <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT5344	93
4.2.1. Análisis proteómico de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 en condiciones de limitación de hierro causadas por quelantes	93
4.2.2. Mutagénesis en el gen <i>fhuA</i> y caracterización de la estirpe mutante	100
4.2.3. Mutagénesis en el gen BN5_0248 (<i>orf3</i>).....	105
4.2.4. Determinación de hierro intracelular en la estirpe silvestre <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.....	107
4.2.5. Análisis proteómico mediante 2D-PAGE de la respuesta global a cianuro en <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT5344.....	108
4.2.6. Mutagénesis del gen <i>dctP1</i> y caracterización de la estirpe mutante	112
4.2.7. Mutagénesis del gen <i>dctP2</i> y caracterización de los mutantes <i>dctP2Q2⁻</i> y <i>dctP1⁻/dctP2Q2⁻</i>	118
4.2.8. Mutagénesis de los genes <i>dapA</i> y <i>ahpC</i> y caracterización de las estirpes mutantes	124
5. DISCUSIÓN	137
5.1. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA RESPUESTA A CIANURO	137
5.2. ANÁLISIS PROTEÓMICO Y MUTACIONAL DE LA LIMITACIÓN DE HIERRO Y LA RESPUESTA A CIANURO	146
6. CONCLUSIONES	157
7. BIBLIOGRAFÍA	159

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Procesos de biorremediación por atenuación natural.....	12
Figura 2: Relación entre el ión CN^- y el HCN según el pH.....	18
Figura 3: Cianogénesis.....	24
Figura 4: Reacciones químicas que involucran al hierro en la formación de especies reactivas de oxígeno.....	35
Figura 5: Ruta de biosíntesis de la lisina y del dipicolinato, un quelante de hierro.....	38
Figura 6: Principales especies reactivas de oxígeno (ROS).....	39
Figura 7: Concentración de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivos.....	72
Figura 8: Diseño experimental de las micromatrices de DNA.....	73
Figura 9: Número de spots válidos en las distintas matrices.....	73
Figura 10: Análisis de las intensidades de los distintos arrays.....	74
Figura 11: Representación de la distribución de intensidades normalizadas.....	75
Figura 12: Diagrama de cajas de los valores de intensidad de cada array después de la normalización.....	75
Figura 13: Gráficos MA de cada array.....	76
Figura 14: Análisis de componentes principales de los arrays.....	77
Figura 15: Agrupación de los datos obtenidos en los microarrays.....	78
Figura 16: Genes afectados por $NaCN$, residuo o $-N$ respecto a NH_4Cl	79
Figura 17: Diagrama de Venn con el número de genes afectados específicamente por $NaCN$, residuo o $-N$, o compartidos.....	80
Figura 18: Clasificación funcional de genes afectados por cianuro sódico y residuo joyero con respecto a amonio.....	84
Figura 19: Clasificación funcional de genes exclusivamente afectados por $NaCN$	85
Figura 20: Clasificación funcional de genes exclusivamente afectados por residuo cianurado procedentes de la industria joyera.....	86
Figura 21: Validación de los datos de microarrays mediante RT-PCR cuantitativa.....	92
Figura 22: Análisis proteómico de <i>P. pseudoalcaligenes</i> con alta o baja concentración de hierro.....	96
Figura 23: Respuesta a cianuro de <i>P. pseudoalcaligenes</i> a tiempos cortos.....	100

Figura 24: Entorno génico del gen <i>fhuA</i>	101
Figura 25: Construcción del mutante en el gen <i>fhuA</i>	102
Figura 26: Efecto del quelante desferrioxamina en el mutante <i>fhuA</i> ⁻	103
Figura 27: Efecto del hierro y el cianuro en el mutante <i>fhuA</i> ⁻	104
Figura 28: Entorno génico de <i>orf3</i>	105
Figura 29: Construcción del mutante en el gen <i>orf3</i>	106
Figura 30: Efecto del cianuro en el contenido intracelular de hierro.....	107
Figura 31: Análisis proteómico de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 con KNO ₃ 2 mM o NaCN 2 mM como fuente de nitrógeno.....	109
Figura 32: Componente periplásmico de un transportador de ácidos dicarboxílicos DctP1 inducido por cianuro en <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT5344.....	112
Figura 33: Entorno génico del gen <i>dctP1</i>	113
Figura 34: Construcción del mutante en el gen <i>dctP1</i>	114
Figura 35: Crecimiento de las estirpes silvestre y mutante <i>dctP1</i> ⁻ de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.....	115
Figura 36: Crecimiento de las estirpes silvestre y mutante <i>dctP1</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 con diferentes fuentes de carbono.....	116
Figura 37: Caracterización de las estirpes silvestre y mutante <i>dctP1</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.....	117
Figura 38: Entorno génico del gen <i>dctP2</i>	118
Figura 39: Construcción del mutante <i>dctP2Q2</i> ⁻	120
Figura 40: Crecimiento de la estirpe silvestre y los mutantes <i>dctP2Q2</i> ⁻ y <i>dctP1</i> / <i>dctP2Q2</i> ⁻ de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 con diferentes fuentes de carbono.....	122
Figura 41: Curva de crecimiento de las estirpes silvestre y mutantes <i>dctP2Q2</i> ⁻ y <i>dctP1</i> / <i>dctP2Q2</i> ⁻ de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 con NaCN.....	123
Figura 42: Entorno génico del gen <i>dapA</i>	124
Figura 43: Relación filogenética de la proteína DapA de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 con proteínas homólogas.....	125
Figura 44: Entorno génico del gen <i>ahpC</i>	126

Figura 45: Relación filogenética de la proteína AhpC de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 con proteínas homólogas.....	127
Figura 46: Construcción del mutante en el gen <i>dapA</i> ⁻	129
Figura 47: Construcción del plásmido pk18mob-ahpC.....	130
Figura 48: Efecto de la desferrioxamina en los mutantes <i>dapA</i> ⁻ y <i>ahpC</i> ⁻	131
Figura 49: Crecimiento con cianuro de la estirpe silvestre y mutantes <i>dapA</i> ⁻ y <i>ahpC</i> ⁻	132
Figura 50: Efecto del H ₂ O ₂ en las estirpes silvestre y mutante <i>ahpC</i> ⁻	133
Figura 51: Crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> silvestre y mutante <i>ahpC</i> ⁻ con H ₂ O ₂ 8,8 mM	134
Figura 52: Actividad catalasa de la estirpe silvestre <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 y el mutante <i>ahpC</i> ⁻	135
Figura 53: Crecimiento del mutante <i>ahpC</i> con NH ₄ Cl o cianuro en presencia de H ₂ O ₂ 8,8 mM	136

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Complejos cianurados	17
Tabla 2: Complejos cianuro-metálicos. Están ordenados en orden decreciente de estabilidad	20
Tabla 3. Solubilidad de distintos ferrocianuros y ferricianuros	22
Tabla 4: Rutas biológicas de degradación del cianuro	25
Tabla 5: Principales tratamientos físico-químicos para la eliminación del cianuro	29
Tabla 6: Ventajas y desventajas de la degradación biológica del cianuro	30
Tabla 7: Investigaciones sobre la degradación de cianuro	31
Tabla 8: Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo.....	47
Tabla 9: Plásmidos empleados.....	47
Tabla 10: Antibióticos empleados	49
Tabla 11: Cebadores utilizados en reacciones de PCR.....	55
Tabla 12: Programa de IEF	67
Tabla 13: Términos GO enriquecidos, pertenecientes a la categoría "función molecular", específicos de cianuro, residuo o hambre de nitrógeno respecto a amonio.....	81
Tabla 14: Términos GO enriquecidos, pertenecientes a la categoría "proceso biológico", específicos de cianuro, residuo o hambre de nitrógeno utilizando amonio como control	82
Tabla 15: Términos GO enriquecidos, pertenecientes a la categoría "función biológica", compartidos por dos o tres condiciones con respecto a amonio.....	83
Tabla 16: Algunos genes de interés afectados en condiciones de -N.	87
Tabla 17: Comparación de algunos genes de interés en las distintas condiciones de estudio	89
Tabla 18: Identificación de las manchas del análisis proteómico de <i>P. pseudoalcaligenes</i> afectadas por limitación de hierro	97
Tabla 19: Análisis comparativo entre los resultados proteómicos obtenidos en limitación de hierro y los transcriptómicos en respuesta a cianuro de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344	98
Tabla 20: Análisis comparativo proteómico de las proteínas afectadas por la disponibilidad de hierro.....	99

Tabla 21: Identificación de las manchas del análisis 2D-PAGE de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 inducidas por cianuro..... 110

Tabla 22: Análisis comparativo transcriptómico y proteómico de componentes inducidos por cianuro 111

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	grados centígrados
A	absorbancia
Ap	ampicilina
ATP	adenosina trifosfato
BSA	seroalbúmina bovina
BTEX	benceno, tolueno, etilbenceno y xileno
cDNA	DNA complementario
CHAPS	3-[(3-cloramidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato)
C/N	balance carbono/nitrógeno
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNasa	desoxirribonucleasa
dNTPs	desoxinucleótidos
DTE	ditioeritritol
DTT	ditiotreititol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FUR	Ferric Uptake Regulator
FURTA	Fur Titration Assay
Gm	gentamicina
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IEF	isoelectroenfoque
IPTG	isopropil- β -D-galactopiranosido
kb	kilobases
Kd	constante de disociación
Km	kanamicina
LB	Medio Luria-Bertani
mA	miliamperio
MALDI-TOF	"matriz-assisted laser desorpt ionization, time of fly"
MW	peso molecular
MTBE	metil tertbutil éter

NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducida
Nx	ácido nalidíxico
p/v	relación peso/volumen
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PAHs	hidrocarburos aromáticos policíclicos
pb	pares de bases
PCBs	policlorobifenilos
PCE	eticiclidina
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pI	punto isoeléctrico
PMF	huella peptídica
PMSF	fluoruro de metilfenilsulfonilo
ppm	partes por millón
q-PCR	Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente a tiempo real
RNA	ácido ribonucleico
RNasa	ribonucleasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Reacción de retrotranscripción
rpm	revoluciones por minuto
SAD	ácido fuerte disociable
SDS	dodecil sulfato sódico
SOD	superóxido dismutasa
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TCE	tricloroetileno
TNT	trinitrotolueno
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
U	unidades
CFU	unidades formadoras de colonias
UV	ultravioleta
v/v	relación volumen/volumen

X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
WAD	ácido débil disociable
ZUR	Zinc Uptake Regulator
Pipes	Piperazine-1,4-bis (ácido 2-etano-sulfónico)
2D-PAGE	electroforesis bidimensional en gel de acrilamida

RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

El cianuro es un compuesto natural muy tóxico para los seres vivos debido a su elevada afinidad por los metales, lo que provoca la inhibición de metaloenzimas, algunas de ellas esenciales para la vida. Además, esta afinidad del cianuro por los metales podría disminuir de la biodisponibilidad de algunos metales necesarios para procesos biológicos específicos. Muchos organismos son capaces de producir cianuro (cianogénesis), tolerarlo e incluso asimilarlo. Las plantas son la mayor fuente de producción de cianuro en la naturaleza. Algunos microorganismos, incluidos los cianogénicos, han desarrollado mecanismos de resistencia frente a este compuesto tóxico, basados principalmente en la síntesis de una oxidasa alternativa insensible a cianuro implicada en la respiración. La asimilación de cianuro por parte de organismos denominados cianotrofos requiere, además de un sistema de resistencia, una ruta de degradación de cianuro que confiriera la capacidad de utilizar este compuesto como fuente de nitrógeno. Estos organismos cianotrofos tienen un importante potencial biotecnológico ya que pueden ser utilizados en procesos de biorremediación de residuos contaminados con cianuro, incluyendo efluentes procedentes de la joyería y la minería.

Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344 es una bacteria cianotrofa aislada del río Guadalquivir a su paso por Córdoba. Su carácter alcalófilo permite utilizar condiciones de pH superiores al pK_a del par cianuro/ácido cianhídrico (9,2), disminuyendo así el riesgo de volatilización del ácido cianhídrico (HCN) a la atmósfera. Varios estudios han elucidado los principales mecanismos de resistencia y asimilación de cianuro en esta bacteria. En la ruta de asimilación, el cianuro reacciona químicamente con el oxalacetato generando una cianhidrina que es posteriormente utilizada como sustrato por la nitrilasa NitC para formar amonio. A pesar de que la resistencia y asimilación de cianuro han sido ampliamente estudiadas en este microorganismo, se desconoce la respuesta global de la cepa CECT5344 en el metabolismo del cianuro. La secuenciación y el análisis del genoma completo de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 ha posibilitado llevar a cabo en este trabajo estudios proteómicos y transcriptómicos en respuesta a cianuro. De forma específica se ha estudiado la homeostasis del hierro en relación con el cianuro. Así, se ha establecido la respuesta, a nivel proteómico, de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en condiciones de limitación de hierro. Las proteínas inducidas en estas condiciones de escasez de hierro no

se indujeron por cianuro, por lo que se descartó que el cianuro genere deficiencia de hierro en la estirpe CECT5344.

Mediante micromatrices de DNA se llevó a cabo el análisis transcriptómico de esta bacteria cianotrofa en respuesta a cianuro, a residuo cianurado de la joyería y a condiciones de limitación de nitrógeno. Con los datos obtenidos se realizó un análisis funcional, lo que permitió conocer procesos biológicos específicamente afectados por cianuro, incluyendo el sistema de respiración insensible a cianuro (CIO) y algunas nitrilasas (entre ellas, la nitrilasa NitC). Específicamente inducidos por el residuo joyero se han encontrado genes de tolerancia a metales, tales como genes relacionados con sistemas de extrusión de metales y genes reguladores. Algunos componentes inducidos por cianuro, posiblemente implicados en la resistencia a cianuro, fueron estudiados mediante un análisis mutacional. Los mutantes deficientes en las proteínas DapA (dihidropicolinato sintasa) y AhpC (alquilhidroperóxido reductasa) presentaron un fenotipo sensible a cianuro, lo que confirmó que ambas proteínas participan en el metabolismo del cianuro. En el caso de la proteína DapA podría participar en la reorganización de los centros sulfoferricos afectados por el cianuro, mientras que AhpC podría estar involucrada en la resistencia al estrés oxidativo generado por el cianuro.

ABSTRACT

Cyanide is a natural toxic compound that displays a very high affinity for metals, inhibiting metalloenzymes which are essential for life. This affinity of cyanide for metals may also be responsible of a decrease in the bioavailability of essential metals for specific biological processes. A large number of microorganisms are able to synthesize (cyanogenics), tolerate or even assimilate cyanide (cyanotrophics). Plants are the main source of cyanide in nature. Some microorganisms, including cyanogenics, have developed mechanisms of resistance forward cyanide, mainly based on the synthesis of a cyanide insensitive alternative oxidase. In addition to a cyanide resistance system, cyanide assimilation requires a degradation pathway in order to use cyanide as a nitrogen source. Cyanotrophic microorganisms have a significant biotechnological potential because they can be applied in bioremediation of industrial cyanide-containing wastewaters, including jewelry and mining residues.

Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344 is a cyanotrophic bacterium isolated from the Guadalquivir River (Córdoba). This is an alkaliphilic bacterium, with an optimum pH of growth of 9,5-10. This fact allows to establish a very alkaline pH value, higher than the pK_a 9,2 of the CN^-/HCN pair, thus avoiding HCN losses. Several studies have elucidated the main mechanisms of cyanide resistance, as well as the cyanide assimilation pathway in *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. In this bacterium cyanide chemically reacts with oxaloacetate producing a cyanohydrin that it is further metabolised to ammonia by the nitrilase NitC. Although cyanide resistance and assimilation have been studied in detail in this bacterium, the global response to cyanide of the strain CECT5344 is unknown. Sequencing and analysis of the whole genome of *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 has facilitated to carry out this work that includes transcriptomic and proteomic studies in response to cyanide. Specifically, we have studied iron bioavailability related with cyanide, and the response of *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 to iron starvation at proteomic level has been established. Proteins induced by iron starvation were not present in the proteome of cyanide-assimilating cells, discarding the hypothesis that cyanide causes iron stress in the strain CECT5344.

DNA microarrays were performed in order to study the transcriptome of this cyanotrophic strain in response to cyanide, as well as to cyanide-containing wastewater and

nitrogen starvation conditions. A functional analysis of the results allowed the identification of specific biological processes affected by cyanide, including the cyanide insensitive oxidase (CIO) for respiration in the presence of cyanide and several nitrilases (one of them, the nitrilase NitC). Specifically induced by the jewelry residue were genes involved in tolerance to metals like regulatory genes and metal extrusion related genes. Some of the cellular components induced by cyanide, and possibly involved in cyanide resistance, were studied by mutational analysis. Mutant strains deficient in DapA (dihydrodipicolinate synthase) or AhpC (alkyl hydroperoxide reductase) presented a phenotype more sensitive to cyanide, thus confirming the participation of these proteins in cyanide metabolism in *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. The DapA protein could participate in the reorganization of the iron-sulphur clusters, a target for cyanide, while AhpC could be involved in the resistance to oxidative stress generated by cyanide.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

La contaminación es la acumulación de compuestos en un medio que provocan que éste sea inseguro o no apto para su uso. El medio puede ser un ecosistema, un medio físico o un ser vivo. El contaminante puede ser un compuesto químico o energía (sonido, calor, luz, etc.). La contaminación es siempre una alteración negativa del estado natural del medio, y por lo general, se genera como consecuencia de la actividad humana, considerándose una forma de impacto ambiental.

Debido a que la contaminación es inherente a las actividades del ser humano, podemos considerar que esta siempre ha existido. Desde la aparición del *Homo sapiens* existen evidencias de la acumulación de herramientas de piedra que cayeron en desuso y de restos de hollín hallados en el techo de cuevas prehistóricas que indican altos niveles de contaminación asociados a una inadecuada ventilación de las fogatas. Los grupos dedicados a la recolección y la caza acumulaban grandes cantidades de desechos, sobre todo en las cuevas que eran ocupadas durante parte del año a lo largo de muchos siglos. Sin embargo, la poca densidad demográfica de los grupos de cazadores recolectores y la presión cinegética de bajo nivel que ejercían sobre los recursos, hacían que la contaminación generada por estos grupos fuera perfectamente asimilada por los diferentes ecosistemas (Godelier, 1974).

Fue la revolución industrial la que inició la contaminación tal y como la conocemos hoy, convirtiéndose así en un grave problema medioambiental. La aparición de grandes fábricas y el consumo de inmensas cantidades de carbón y otros combustibles fósiles aumentaron la contaminación del aire y ocasionaron un gran volumen de vertidos químicos industriales al ambiente, a los que hay que sumar el aumento de residuos humanos no tratados. La contaminación se convirtió en un asunto de gran importancia tras la Segunda Guerra Mundial, después de que se hiciesen evidentes las repercusiones de la lluvia radiactiva ocasionada por la guerra y los ensayos nucleares. En Londres ocurriría un evento catastrófico de tipo local, conocido como la Gran Niebla de 1952, que mató a unas 4 000 personas. Este trágico evento hizo que en 1955 se expidiera la Ley del Aire Limpio. En los Estados Unidos la contaminación comenzó a recibir la atención pública a mediados de la

década de 1950 y a principios de los años 70 se tramitaron la Ley del Agua Limpia, la Ley de Política Ambiental y la Ley del Ruido. Catástrofes internacionales como el hundimiento en 1978 del petrolero Amoco Cádiz en las costas de Bretaña, y el desastre de Bhopal ocurrido en 1984 debido a un escape de isocianato de metilo, han demostrado la universalidad de dichos eventos y la magnitud de la ayuda requerida para remediarlos, haciendo que el problema de la contaminación sea considerado a nivel mundial.

1.1.1. Formas de contaminación

La contaminación puede afectar a distintos medios, siendo sus consecuencias muy diversas. A continuación se explican las más relevantes (Gilden *et al.*, 2010).

1.1.1.1. Según el medio físico

- **Contaminación atmosférica:** Consiste en la liberación de compuestos químicos o partículas a la atmósfera, alterando su composición y suponiendo un riesgo para la salud de las personas y de los demás seres vivos. Los gases contaminantes del aire más comunes son el monóxido de carbono, el dióxido de azufre, los compuestos clorofluorocarbonos y los óxidos de nitrógeno producidos por la industria y en la combustión de los vehículos. Los compuestos fotoquímicos, como el ozono, aumentan en el aire por los óxidos de nitrógeno e hidrocarburos al reaccionar en presencia de luz solar.
- **Contaminación hídrica:** Es debida a la liberación de residuos y contaminantes que drenan a las escorrentías y luego son transportados hacia ríos, penetrando en aguas subterráneas o descargando en lagos o mares. Este tipo de contaminación se ocasiona por derrames de aguas residuales, eutrofización o descarga de basura. También, la liberación descontrolada de dióxido de carbono produce contaminación hídrica por la acidificación de los océanos.
- **Contaminación del suelo:** Ocurre cuando productos químicos son liberados por derrames o filtraciones sobre y bajo la tierra. Entre los contaminantes del suelo más significativos se encuentran los hidrocarburos como el petróleo y sus derivados, los metales pesados, el metil tertbutil éter (MTBE), los herbicidas y

plaguicidas, generalmente rociados a los cultivos industriales y monocultivos, y los compuestos organoclorados producidos por la industria.

1.1.1.2. Según la naturaleza del contaminante

Existen muchos agentes contaminantes los cuales se pueden clasificar según su naturaleza, y todos ellos pueden afectar a la salud o producir daños en los ecosistemas o el medioambiente (Cecinato *et al.*, 2012; Topić-Popović *et al.*, 2015). Además, algunos contaminantes gaseosos juegan un papel muy importante en diferentes fenómenos atmosféricos, como la lluvia ácida, el debilitamiento de la capa de ozono y el cambio climático.

- **Contaminación natural:** Está provocada por agentes y partículas naturales y en ella no interviene la acción humana. Entre las causas más frecuentes de este tipo de contaminación se encuentran los huracanes, los incendios y los volcanes. Como consecuencia de estos fenómenos se transportan diferentes elementos o se emiten gases que son arrojados en zonas, que en un futuro, pueden provocar contaminación, como puede ser en zonas de agua o en el aire.
- **Contaminación xenobiótica:** En la actualidad, existen del orden de 70 000 productos químicos sintéticos, incrementándose cada año entre 200 y 1 000 nuevas sustancias químicas (Maradonna *et al.*, 2015). Los efectos que producen estas sustancias en algunos casos son conocidos, pero en otros se sabe poco sobre sus acciones potenciales sobre los humanos y sobre el medioambiente a largo plazo. Así, un proceso cancerígeno originado por un producto químico puede, en algunos casos, tardar de 15 a 40 años en manifestarse. Las principales sustancias químicas contaminantes son los fertilizantes, los plaguicidas y herbicidas, las dioxinas, los polifenilos, detergentes y dispersantes del petróleo, etc.
- **Contaminación radiactiva:** Es resultado de las actividades en física atómica. Puede ser resultado de graves desperfectos en plantas nucleares o por investigaciones, manufactura y uso de materiales radioactivos.
- **Contaminación genética:** Es la transferencia incontrolada o no deseada de material genético hacia una población silvestre.

- **Contaminación electromagnética:** Es producida por las radiaciones del espectro electromagnético generadas por equipos electrónicos u otros elementos producto de la actividad humana, como torres de alta tensión y transformadores, las antenas de telefonía móvil y los electrodomésticos.
- **Contaminación por sustancias naturales como consecuencia de la actividad humana:** incluye a los metales pesados (mercurio, cadmio, plomo, cobre, cinc, etc.), al cianuro (minería, joyería), a los compuestos alifáticos y aromáticos naturales (vertido de petróleo) y a los gases con efecto invernadero (dióxido de carbono, CO_2 , metano, CH_4 ; dióxido de nitrógeno, NO_2 y óxido de nitrógeno, NO).

1.1.2. Desarrollo sostenible y legislación internacional para el control de la contaminación

La contaminación causa muchas enfermedades en el ser humano y estas dependen del contaminante que las origine. Pueden ser enfermedades respiratorias, cardiovasculares, digestivas, cáncer, disminución de la fertilidad, etc. La contaminación también afecta a los ecosistemas, con procesos como el calentamiento global, el efecto invernadero, la aparición de especies invasoras, el agujero de la capa de ozono, la lluvia ácida y la acidificación de los océanos. Por este motivo, es necesario controlar las emisiones y efluentes que se liberan al aire, agua y suelo, y minimizar los residuos generados, adoptando una economía de desarrollo sostenible que asegure que los recursos para satisfacer a la población actual estén disponibles sin comprometer el desarrollo de las futuras generaciones. El desarrollo sostenible también forma parte de los "Objetivos de Desarrollo del Milenio" de Naciones Unidas, que busca garantizar el sustento del medio ambiente. La gestión ambiental indica las prácticas comunes que se pueden desarrollar para lograr un desarrollo sostenible, como reducir la contaminación relacionada con la gestión de residuos, minimización de residuos y ahorro de energía (eléctrica o combustibles fósiles) mediante el reciclaje, la reutilización, la reducción, la prevención y la mitigación del cambio climático.

El desarrollo sostenible que se pretende es, en parte, apoyado por la actual legislación vigente sobre control de la contaminación. A finales de la década de los 60, la contaminación y el deterioro medioambiental comenzaron a ser considerados como un problema político en varios países industrializados. Como consecuencia de la toma de

conciencia y de la preocupación que se fue generando, muchos países fueron introduciendo una legislación medioambiental, y sobre la década de los 80 se crearon agencias de protección medioambiental en distintos países, así como en organizaciones internacionales como la ONU. Desde entonces se han firmado importantes tratados y convenios internacionales encaminados a solventar o mitigar importantes problemas medioambientales (Protocolo de Montreal, 1987; Convención de Estocolmo, 2004; Protocolo de Kioto, 2005).

1.2. LA BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de las bacterias, hongos y plantas, o las enzimas derivadas de ellos, para transformar compuestos contaminantes en compuestos más simples y poco o nada contaminantes (Castillo *et al.*, 2005). Suele utilizarse para limpiar suelos o aguas contaminadas (Glazer y Nikaido, 1995), pero ámbito de aplicabilidad es muy amplio, pudiendo considerarse como objeto cada uno de los estados de la materia (Atlas y Unterman, 1999):

- **Sólido:** con aplicaciones sobre medios contaminados como suelos o sedimentos, o bien directamente en lodos, residuos, etc.
- **Líquido:** aguas superficiales y subterráneas, aguas residuales.
- **Gas:** emisiones industriales, así como productos derivados del tratamiento de aguas o suelos.

1.2.1. Ventajas e inconvenientes de la biorremediación

Entre las principales ventajas de la biorremediación destacan las siguientes:

- Mientras que los tratamientos físicos, y buena parte de los químicos, están basados en transferir la contaminación entre medios gaseoso, líquido y sólido, en la biorremediación se transfiere poca contaminación de un medio a otro.
- Es una tecnología poco intrusiva en el medio y generalmente no requiere componentes estructurales o mecánicos dignos de destacar.
- Comparativamente con los tratamientos físico-químicos, es económica y, al tratarse de un proceso natural, suele tener aceptación por parte de la opinión pública.

Sin embargo, la biorremediación tiene también inconvenientes y limitaciones. La biodegradación incompleta puede generar intermediarios metabólicos, con un poder contaminante similar o incluso superior al producto de partida. Por otra parte, algunos compuestos son resistentes o inhiben la biorremediación. El tiempo requerido para un tratamiento adecuado puede ser difícil de predecir, y el seguimiento y control de la velocidad y/o extensión del proceso es laborioso. La aplicabilidad de esta técnica depende de varios factores (Castillo *et al.*, 2005):

- **Propiedades del contaminante (biodegradabilidad).** En general, los hidrocarburos alifáticos se degradan rápidamente. Las estructuras más ramificadas, al producir impedimentos estéricos son más difíciles de degradar que las cadenas lineales. Las cadenas ramificadas de sulfonatos de alquilo o arilo a menudo se degradan muy lentamente. Los dobles enlaces hacen la molécula más resistente, así como un incremento del número de anillos bencénicos. Las sustituciones químicas (ácidos dicarboxílicos, nitrilos, metilaciones, halogenaciones) también hacen la molécula más resistente. Por otra parte, la biodegradación de compuestos que contienen nitrógeno o azufre está ligada frecuentemente a su utilización como nutrientes.
- **Presencia de comunidades microbianas adecuadas.** Las comunidades microbianas deben tener la capacidad enzimática para metabolizar el compuesto contaminante. Los microorganismos pueden ser autóctonos (biorremediación intrínseca o atenuación) o añadidos al sistema para mejorar la degradación (bioaumento).
- **Disponibilidad del contaminante.** Es un factor crítico, más importante que la propia presencia de comunidades microbianas. Para que la degradación de un contaminante pueda producirse es necesario que interactúe con la célula en medio acuoso. Inicialmente lo hará con la parte exterior de su pared, para posteriormente ser transportado al interior de la misma. La forma más común de transporte es la formación de complejos con proteínas extracelulares producidas por los microorganismos. Muchos contaminantes orgánicos, como los derivados del petróleo, PCBs, hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno, pireno, fluoreno), solventes halogenados, etc., son hidrofóbicos y tienden a adsorberse a las partículas más finas del suelo, concretamente a la fracción orgánica (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y humina). Esta es una de las causas de la persistencia de muchos pesticidas. La producción de surfactantes o emulsionantes por los microorganismos es un factor

determinante, ya que atenúa este problema y facilita la degradación. Los biosurfactantes disminuyen la tensión superficial del agua (agentes tensioactivos), mientras que los bioemulsionantes estabilizan las emulsiones entre el agua y otro líquido. Con ambos compuestos se facilita la disponibilidad de los compuestos hidrofóbicos y, en última instancia, su biodegradación.

- **Condiciones del medio contaminado.** Propiedades que permiten o limitan el crecimiento microbiano y el metabolismo del compuesto. A veces es necesario modificar las condiciones, por ejemplo, añadiendo nutrientes o aireando (bioestimulación).

1.2.2. Tipos de biorremediación

Se puede realizar una clasificación de la biorremediación en función de los contaminantes con los que se puede trabajar (Alexander, 1999; Eweis *et al.*, 1999):

- Hidrocarburos en general (compuestos orgánicos volátiles, como benceno, tolueno, etilbenceno y el xileno (BTEX), hidrocarburos aromáticos policíclicos o PAHs).
- Hidrocarburos clorados (policlorobifenilos o PCBs, tricloroetileno o TCE, eticiclidina o PCE, pesticidas, herbicidas).
- Compuestos nitroaromáticos (trinitrotolueno o TNT).
- Metales pesados: estos no se metabolizan por los microorganismos, pero pueden ser inmovilizados o precipitados.
- Otros contaminantes: compuestos organofosforados, cianuros, fenoles, etc.

Desde un punto de vista metodológico, existen tres tipos principales de biorremediación: la atenuación natural, la bioestimulación y el bioaumento (Castillo *et al.*, 2005).

Se denomina atenuación natural o biorremediación intrínseca a la que, sobre muchos compuestos orgánicos, llevan a cabo los microorganismos autóctonos, principalmente bacterias, del medio afectado (Rosenberg y Ron, 1996). En presencia de oxígeno (condiciones aerobias) los microorganismos, en última instancia, convierten los contaminantes en dióxido de carbono, agua y biomasa celular microbiana, proceso conocido como mineralización (Fig. 1). Este proceso de biodegradación aeróbica es la que tuvo lugar en muchos de los lugares afectados por el vertido del Prestige.

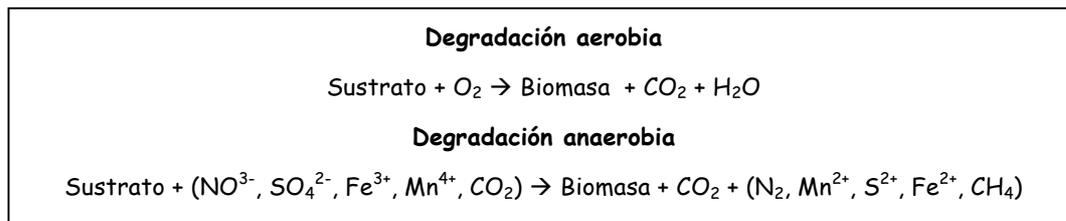


Figura 1: Procesos de biorremediación por atenuación natural

En el caso de escasez de oxígeno (condiciones anaeróbicas), los microorganismos dependen de otros aceptores de electrones disponibles (nitrato, sulfato, formas oxidadas de Fe, Mn), produciéndose una biodegradación anaerobia (Heider *et al.*, 1999).

En condiciones ideales, los contaminantes se transforman en compuestos químicos más simples, no peligrosos para los posibles receptores ni para el medio. Desgraciadamente, además de la propia recalcitrancia intrínseca de la molécula, hay bastantes factores que pueden limitar o impedir la atenuación natural en un medio contaminado, entre los que se incluyen:

- Carencia de nutrientes esenciales para los microorganismos (por ejemplo, nitrógeno y/o fósforo).
- Ausencia de aceptores de electrones adecuados (generalmente oxígeno).
- Inexistencia de condiciones medioambientales apropiadas (pH, potencial rédox, humedad, temperatura, etc.).
- Ausencia de poblaciones microbianas con el potencial enzimático necesario para degradar los contaminantes.
- Presencia de componentes tóxicos para los microorganismos en la mezcla contaminante.

La bioestimulación consiste en la introducción de modificaciones en el medio, mediante el aporte de nutrientes, aireación y otros procesos. En ocasiones es suficiente añadir oxígeno mediante aireación, aunque en otros se podría requerir la adición de nutrientes o ajustes de pH. En todo caso, estas aproximaciones son válidas siempre y cuando los microorganismos autóctonos sean capaces de degradar el contaminante tras un proceso más o menos largo de aclimatación previa (Castillo *et al.*, 2005).

En lo que se refiere a la adición de nutrientes, la biorremediación requiere que estos entren en contacto con el área impregnada por el contaminante y que su concentración sea suficiente para soportar el crecimiento máximo previsto de la población microbiana degradadora en el transcurso de las operaciones de remediación (Al-Kindi y Abed, 2016).

El bioaumentación es otra línea de investigación que conlleva la introducción en el medio de microorganismos aclimatados, o incluso modificados genéticamente, con el fin de mejorar la biodegradación (Walter, 1997; Atlas y Unterman, 1999). Esta técnica funciona en condiciones de laboratorio o biorreactores, pero en ambientes externos (suelo, agua) su implantación depende de una serie de factores (Alexander, 1999), entre los que cabe destacar:

- El tamaño de la población de microorganismos degradadores, que crece rápidamente como respuesta a la contaminación del medio, pero es muy difícil, si no imposible, incrementar la población microbiana más allá de esos valores.
- La capacidad de carga de muchos ambientes, que viene determinada por factores tales como la presencia de toxinas, nutrientes y condiciones ambientales, movilidad y/o distribución de los microorganismos y la presencia de abundante materia orgánica.
- Los microorganismos añadidos, que deben sobrevivir a los depredadores y competir con éxito con la población autóctona antes de ocupar los nichos potenciales.
- En general, los ambientes más selectivos y la utilización de consorcios microbianos favorecen el bioaumentación.

La capacidad de obtener en el laboratorio, mediante manipulación genética, microorganismos con mejores propiedades degradativas de compuestos contaminantes no debe oscurecer el hecho de que, en los ambientes naturales, los microorganismos poseen una notable capacidad de adaptación, lo que se favorece por su integración en poblaciones dentro de una comunidad. La base de este fenómeno se encuentra, por una parte, en la adquisición de nuevas capacidades metabólicas, mediante mecanismos convencionales de variación genética (mutación, conversión génica, duplicación, transposición) o intercambio de genes y, por otra, en la posibilidad de complementación de las actividades metabólicas de los distintos grupos. La capacidad de intercambio genético entre las poblaciones,

mediante conjugación, transformación y transducción, constituye una fuerza notable en la evolución que conduce a la adaptación a nuevos ambientes, incluyendo los contaminados (Paul, 1999).

La complementación de las actividades metabólicas se lleva a cabo mediante relaciones de cometabolismo y/o sintrofia. El cometabolismo es una actividad importante desde el punto de vista medioambiental. Implica, esencialmente, el metabolismo "gratuito" (es decir, no útil para el crecimiento u obtención de energía) de un sustrato secundario (compuesto contaminante) por enzimas que requieren otro sustrato primario diferente, el cual proporciona la energía y/o los cofactores reductores necesarios. Ambas actividades enzimáticas pueden ser diferentes y el resultado es, en teoría, la acumulación de productos de reacción a partir del contaminante. En la práctica, la existencia de otros microorganismos hace factible la degradación posterior de esos productos mediante reacciones sintróficas y, en última instancia, su mineralización descartando la posibilidad, a tener en cuenta, de que dichos productos sean tóxicos, y/o persistentes (Alexander, 1999; Wackett y Hershberger, 2001). El término de sintrofia, por tanto, implica la acción concertada de diferentes microorganismos sobre un(os) sustrato(s), mediante la combinación de sus actividades metabólicas, lo que permite su degradación. Esta no sería posible en presencia de los microorganismos aislados. Se comprende entonces la importancia de las poblaciones mixtas (que a veces se denominan consorcios) para la degradación más efectiva de los contaminantes orgánicos. Todo esto se refleja en el creciente aumento de datos experimentales, en los que el bioaumentación con consorcios microbianos, tanto a nivel de laboratorio como en el medioambiente, está produciendo resultados esperanzadores, como en casos aplicados a la degradación del petróleo o sus derivados (Mishra *et al.*, 2001; Viñas *et al.*, 2002; Malki *et al.*, 2006).

El uso de la ingeniería genética para crear organismos específicamente diseñados para la biorremediación tiene gran potencial. Por ejemplo, la bacteria *Deinococcus radiodurans*, el organismo más resistente a la radiación que se conoce, ha sido modificado para que pueda consumir el tolueno y los iones de mercurio presentes en los residuos nucleares altamente radioactivos (Brim *et al.*, 2000, Lovley, 2003).

La biorremediación utiliza fundamentalmente microorganismos; sin embargo, en algunos casos también se pueden utilizar plantas (fitorremediación), algas (ficorremediación) u hongos (micorremediación). La fitorremediación no es un concepto

nuevo, pues desde hace 3 000 años los hombres han utilizado la capacidad natural de purificación de las plantas para el tratamiento del agua. Desde la década de 1970, esta práctica ha encontrado un renovado interés, en particular para el tratamiento de plaguicidas, hidrocarburos, metales pesados, radioisótopos, disolventes y explosivos. La fitorremediación se basa principalmente en las interacciones entre las plantas, el suelo y los microorganismos. El suelo es una compleja estructura que sirve de soporte para el desarrollo de las plantas y los microorganismos, que se alimentan de los compuestos orgánicos o inorgánicos que lo componen. Cuando algunos de estos compuestos se encuentra en exceso, con respecto al estado inicial del suelo, éste se considera un suelo contaminado. Los compuestos en exceso pueden ser utilizados como fuente de energía por las plantas y microorganismos. Las plantas y los microorganismos han coevolucionado para adoptar una estrategia de aprovechamiento recíproca, en la que los microorganismos aprovechan los exudados de la raíz como nutrientes, mientras que la planta se beneficia de la capacidad de degradación de los microorganismos rizosféricos, que reducen el estrés debido a la fitotoxicidad de determinados compuestos. En última instancia, la planta es el agente esencial de la exportación de un contaminante fuera de su entorno. Las plantas absorben el contaminante y lo metabolizan o lo almacenan, reduciendo o evitando la movilidad de los contaminantes a otras zonas (fitoestabilización). Con mucha frecuencia, los compuestos orgánicos, xenobióticos o no, pueden ser degradados y metabolizados para el crecimiento de la planta. En el caso de los compuestos inorgánicos contaminantes (metales, metaloides y radionucleidos), únicamente es posible su fitoestabilización o fitoextracción, ya que estos no son biodegradables.

El término micorremediación se refiere al uso de micelios fúngicos para la biorremediación. Uno de los principales papeles de los hongos en los ecosistemas es el de la descomposición de la materia orgánica. Estos segregan enzimas extracelulares y ácidos que sirven para degradar la lignina (polímero orgánico derivado del fenol) y la celulosa (biopolímero compuesto por moléculas de β -glucosa), los dos componentes principales de la pared celular de las células vegetales. Lo fundamental en la micorremediación es identificar la cepa de hongo más apropiada para tratar cada tipo específico de contaminante. Algunas cepas dan buenos resultados para degradar gases neurotóxicos, como el agente VX y el gas sarín (Abu-Qare y Abou-Donia, 2002). El agente VX (nombre militar empleado por la OTAN para denominar a la molécula O-etildiisopropilaminoetilmetilfosfonotiolato) es una sustancia

extremadamente tóxica empleada como arma química y clasificada como agente nervioso. Los agentes nerviosos son los compuestos químicos más tóxicos y de más rápido efecto que se conocen, y son considerados como armas de destrucción masiva por las Naciones Unidas en su Resolución 687. El gas sarín es un compuesto organofosforado con la fórmula $[(\text{CH}_3)_2\text{CHO}]\text{CH}_3\text{P}(\text{O})\text{F}$, que fue desarrollado originalmente como pesticida en 1939 en Alemania. Es un líquido que puede convertirse en vapor (gas) y propagarse al medio ambiente, y que es usado como arma química debido a su extrema potencia como agente nervioso.

1.3. EL CIANURO

El ión cianuro (CN^-) está formado por un átomo de carbono unido con un enlace triple a un átomo de nitrógeno. El anión cianuro presenta un enlace σ , dos enlaces π , y dos orbitales antienlazantes desocupados. Los primeros orbitales de su estructura se llenan con el número máximo de electrones, mientras que los otros orbitales están vacíos. Debido a que los orbitales σ y π están llenos con electrones, el cianuro se comporta como halógeno. Sin embargo, su comportamiento pseudohalógeno no puede explicar la formación de complejos con los metales de la serie de transición como Fe, Co, Ni, Cu y Zn. Los orbitales antienlazantes desocupados del ión cianuro pueden formar orbitales híbridos con los orbitales "d" (parcial o totalmente llenos) de los metales de transición. La contribución de un par de electrones (bien del ión cianuro al metal o viceversa) se conoce como "enlace recíproco" y explica la estabilidad de los complejos cianurados con metales. Por otra parte, el enlace triple del ión cianuro puede romperse fácilmente, siendo el responsable de su elevada reactividad (Luque-Almagro, 2005).

Los distintos compuestos que incorporan en su composición al ión cianuro pueden ser agrupados de la siguiente forma (ver Tabla 1):

- **Cianuro libre:** Comprende el gas ácido cianhídrico (HCN) y el ión cianuro (CN^-) presente en solución. El HCN es volátil a partir de soluciones acuosas y sólo el CN^- tiene capacidad de formar complejos con distintos iones metálicos, y por esta razón este ión es utilizado en aplicaciones industriales.

- **Sales simples de cianuro:** Son compuestos iónicos que se disocian directamente en agua liberando un catión y un anión (CN^-). Son las sales que provienen de reacciones ácido-base como, por ejemplo, NaCN y KCN .
- **Compuestos metálicos débiles (WAD, "ácido débil disociable") de cianuro:** Son compuestos iónicos que se disocian directamente en agua liberando un catión y un anión que contiene al ión cianuro. El anión, denominado "complejo", puede seguir disociándose, produciendo en última instancia un catión y varios aniones cianuro.
- **Compuestos metálicos fuertes (SAD, "ácido fuerte disociable") de cianuro:** Son todos aquellos compuestos cianuro-metálicos solubles que por su gran estabilidad se clasifican como fuertes o estables (hierro, oro, cobalto, etc).
- **Cianuro total:** Comprende el cianuro presente en la solución, en todas sus formas, incluyendo los cianuros estables (complejos de cianuro con hierro).
- **Organocianuros:** Corresponden a compuestos orgánicos que contienen el grupo ciano ($\text{R-C}\equiv\text{N}$), denominados nitrilos o cianuros orgánicos. Los nitrilos son producidos de forma natural o artificial. En esta clase podemos encontrar a las cianhidrinas (2-hidroxinitrilos), los glucósidos cianogénicos, el acetonitrilo y el acrilonitrilo, entre otros.
- **Compuestos derivados del cianuro:** Son compuestos menos tóxicos o esencialmente inocuos que proceden de las transformaciones de compuestos cianurados. Los más importantes son el tiocianato (SCN^-), el cianato (CNO^-), los iones nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-), y el amoníaco (NH_3).

Tabla 1: Complejos cianurados

Clasificación	Compuestos
Cianuros inorgánicos	
• Cianuro libre	CN^- , HCN
• Cianuros simples <ul style="list-style-type: none"> ○ solubles ○ sales neutras insolubles 	NaCN , KCN , $\text{Ca}(\text{CN})_2$, $\text{Hg}(\text{CN})_2$ $\text{Zn}(\text{CN})_2$, $\text{Cd}(\text{CN})_2$, $\text{Ni}(\text{CN})_2$, CuCN , AgCN
• Complejos cianuro-metálicos débiles (WAD)	$\text{Zn}(\text{CN})_4^{2-}$, $\text{Cd}(\text{CN})_3^-$, $\text{Cd}(\text{CN})_4^{2-}$
• Complejos cianuro-metálicos moderadamente fuertes	$\text{Cu}(\text{CN})_2^-$, $\text{Cu}(\text{CN})_3^{2-}$, $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$, $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$
• Complejos cianuro-metálicos fuertes (SAD)	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, $\text{Co}(\text{CN})_6^{4-}$, $\text{Au}(\text{CN})_2^-$
Cianuros orgánicos (nitrilos)	
• Alifáticos	Propionitrilo, acetonitrilo, acrilonitrilo, etc.
• Aromáticos	Benzonitrilo, cianopiridina, etc.
• Glucósidos cianogénicos	Linamarina, amigdalina, durrin, etc.
• Cianolípidos	

Los complejos cianuro-metálicos se pueden disociar en función de varios factores, como disminución de la concentración y disminución del pH, con liberación de CN^- y la consecuente formación de HCN.

En la figura 2 se muestra el equilibrio entre el ión CN^- y el HCN dependiendo del pH. A pH inferior a 8 casi todo el cianuro libre se encuentra como HCN y se pierde por volatilización, mientras que a pH 10,5 casi todo el cianuro libre está presente como CN^- . En condiciones normales de temperatura y presión, las concentraciones de HCN y CN^- son iguales a un valor de pH de aproximadamente 9,0 (Logsdon *et al.*, 2006).

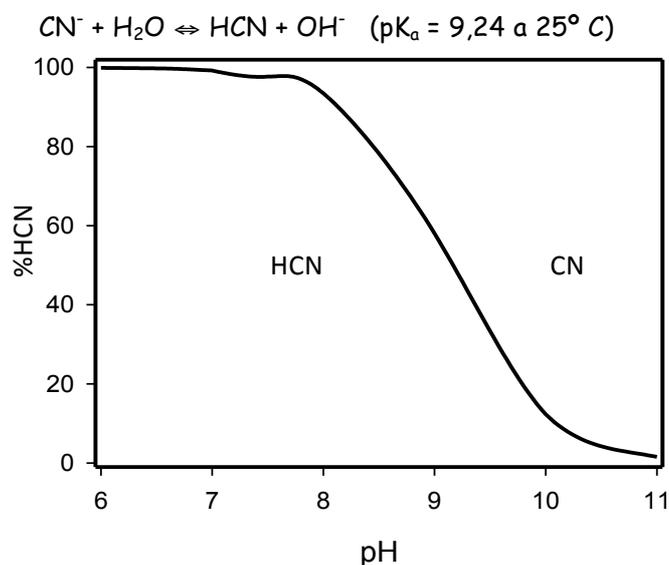


Figura 2: Relación entre el ión CN^- y el HCN según el pH

1.3.1. Compuestos derivados del cianuro

Como resultado de la cianuración, extracción de metales a partir de menas en minería, de la degradación natural o del tratamiento de agua residual, se forman una diversidad de compuestos en disolución, derivados del cianuro, entre los que figuran el tiocianato, el cianato y el amoníaco.

- **Tiocianato:** El tiocianato (SCN^-) se forma por la reacción entre el ión cianuro, el oxígeno y compuestos que contienen azufre, resultando mucho menos tóxico que el cianuro. Los tiocianatos son más estables que los cianatos y que el ión cianuro en solución acuosa. El tiocianato puede degradarse lentamente debido a la acción de diversos microorganismos, los cuales lo oxidan formando amoníaco y sulfato. Ciertos organismos tienen la capacidad de utilizar el tiocianato como una fuente de

nitrógeno, lo cual ocurre sólo después de agotarse todo el amoníaco disponible. Los mecanismos de descomposición química de este compuesto son lentos; además, el tiocianato es resistente a la fotodegradación (Smith y Mudder, 1991).

- **Cianato:** El cianato (CNO^-) es un compuesto generado durante el procesamiento de minerales, debido a la reacción entre el ión cianuro y el oxígeno, o durante el tratamiento de efluentes que contienen cianuro por medio de un agente oxidante como el peróxido de hidrógeno o el ión hipoclorito, entre otros. El cianato es estable en condiciones básicas pero se descompone en medio ácido para generar iones amonio.
- **Amoníaco:** A temperatura ambiente, el cianato y el tiocianato reaccionan lentamente con agua para formar amoníaco (NH_3), anión formiato y/o carbonato (Smith y Mudder, 1991). El NH_3 puede formar complejos metálicos con el cobre o el níquel, pero no compite eficazmente con el cianuro o con el tiocianato como agente para la formación de complejos. El amoníaco libre es tóxico para la mayoría de los seres vivos. Este compuesto se volatiliza a un pH elevado, pero permanece en solución, al igual que el ión amonio, en condiciones de pH neutro. Los principales mecanismos de eliminación del amoníaco en el ambiente acuático son la nitrificación biológica, eliminación por las plantas y la adsorción en las arcillas (Álvarez *et al.*, 2013).

1.3.2. Complejos cianuro-metálicos

Entre los complejos cianuro-metálicos débiles y moderadamente fuertes se encuentran los formados entre el cianuro y el cadmio, el cobre, el níquel, la plata o el zinc (Tabla 1). Estos compuestos se forman de manera gradual a medida que la concentración de cianuro aumenta en la disolución en la que se encuentran los metales. La estabilidad de estos complejos varía según el metal, siendo el zinc y el cadmio los que forman los complejos más débiles y por lo tanto los más tóxicos, ya que liberan CN^- fácilmente. En la tabla 2 se presentan las constantes de disociación de algunos de estos complejos cianuometálicos.

Tabla 2: Complejos cianuro-metálicos. Están ordenados en orden decreciente de estabilidad. Los números romanos indican el estado de óxido-reducción del metal.

Nombre	Fórmula	Constante de disociación (M)
Hexacianoferrato (III) (ferricianuro)	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$	$1,0 \times 10^{-52}$
Hexacianoferrato (II) (ferrocianuro)	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$	$1,0 \times 10^{-47}$
Tetracianomercuriato (II)	$[\text{Hg}(\text{CN})_4]^{-2}$	$4,0 \times 10^{-42}$
Tricianocuproato (I)	$[\text{Cu}(\text{CN})_3]^{-2}$	$5,0 \times 10^{-28}$
Tetracianoniquelato (II)	$[\text{Ni}(\text{CN})_4]^{-2}$	$1,0 \times 10^{-22}$
Dicianoargentato (I)	$[\text{Ag}(\text{CN})_2]^{-1}$	$1,0 \times 10^{-21}$
Tetracianocadmio (II)	$[\text{Cd}(\text{CN})_4]^{-2}$	$1,4 \times 10^{-17}$
Tetracianocincato (II)	$[\text{Zn}(\text{CN})_4]^{-2}$	$1,3 \times 10^{-17}$

La velocidad de disociación de estos complejos, que ocasiona la liberación del ión cianuro, depende de factores como la intensidad de la luz, la temperatura del agua, el pH, el total de sólidos disueltos y la concentración del complejo cianurado. La separación del ión cianuro mediante fotólisis es más acusada para los complejos de cianuro con hierro. En general, una disminución del pH y de la concentración del complejo aumenta el porcentaje del ión cianuro producido. Es la estabilidad de cada complejo la que determina su facilidad de tratamiento y su toxicidad relativa. El parámetro más importante en la determinación de la estabilidad o del grado de disociación de estos complejos cianurados es el pH de la disolución.

Un metal con el que el cianuro reacciona formando complejos octaedrales extremadamente estables es el hierro (Tabla 2). Entre los complejos cianuro-hierro figuran el hexacianoferrato II o ferrocianuro, en el cual el hierro se halla en estado reducido con una valencia +2. El ferrocianuro, que es la forma corriente de disolución a potenciales de óxido-reducción ambientales, se oxida fácilmente a ferricianuro o hexacianoferrato III. En este caso, el hierro está presente en forma férrica oxidada con una valencia +3. El hexacianoferrato II puede formarse por adición de una sal ferrosa soluble o un hidróxido ferroso a una disolución que contenga el ión cianuro. Esta reacción tiene lugar a un pH inferior a 9, mientras que por encima de este pH se produce la disociación del complejo. La adición ferrosa puede ocasionar la precipitación del cianuro dependiendo del pH de la disolución y de los contenidos de cianuro e ión ferroso. La adición del ión ferroso en exceso, combinado con un pH inferior a 4, haría precipitar también otros complejos cianurometálicos. A pesar de su mayor constante de estabilidad, el ión ferroso

no desplaza al zinc, cobre o níquel de sus complejos. El hexacianoferrato III no puede formarse directamente en disolución a partir de hierro férrico y cianuro, probablemente debido a la mayor insolubilidad del hidróxido férrico. Su formación es principalmente el resultado de la oxidación del hexacianoferrato II.

Estos complejos cianuro-hierro requieren especial atención debido a su extrema estabilidad en ausencia de luz y a su tendencia a disociarse en presencia de ella. Ha existido una considerable controversia acerca de la toxicidad relativa de estos complejos cianuro-hierro debido a la fotólisis. Aunque estos complejos resisten la degradación natural hasta que el cianuro libre y los complejos cianuro-metálicos más fácilmente degradables se han eliminado, sin embargo son capaces de liberar cianuro en proporciones tóxicas cuando se exponen a una intensa radiación ultravioleta. Así, se ha determinado que bajo exposición prolongada, los hexacianoferratos II y III liberan entre el 49-85% de su contenido de cianuro, respectivamente (Smith y Mudder, 1991). Sin embargo, estos experimentos se refieren a sistemas cerrados y a niveles de radiación ultravioleta muy altos en comparación con los sistemas naturales.

Los hexacianoferratos experimentan una mayor variedad de reacciones que otros cianuros metálicos, y la química de sus disoluciones ha sido estudiada de un modo más completo. Tanto el ferrocianuro como el ferricianuro forman sales solubles con otros metales sin experimentar cambio del ligando del cianuro. El contenido de cianuro también permanece invariable cuando el ferrocianuro se oxida, reacción que ocurre fácilmente y de manera reversible. Dado que la mayoría de los métodos físico-químicos de eliminación del cianuro dependen de la oxidación, la eliminación de los hexacianoferratos exige tener en cuenta otros aspectos de su comportamiento químico, por ejemplo, la precipitación química. Los hexacianoferratos se clasifican como complejos inertes, cuya estabilidad se debe a que su velocidad de disociación es sumamente baja, al igual que su solubilidad. Aunque los cianuros de hierro precipitados presentes en disoluciones y residuos de minas son principalmente las formas ferro y ferri mezcladas, existen otros compuestos cianurometálicos relativamente insolubles. En la tabla 3 se muestra la solubilidad de varios de estos complejos (Goncalves *et al.*, 1998).

Tabla 3. Solubilidad de distintos ferrocianuros y ferricianuros

Nombre	Fórmula	Solubilidad g/L (T° C)
Ferricianuro amónico	$(\text{NH}_4)_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	Muy soluble
Ferrocianuro amónico	$(\text{NH}_4)_3\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Soluble
Ferricianuro de cobre (I)	$\text{Cu}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	Insoluble
Ferricianuro de cobre (II)	$\text{Cu}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)_2 \cdot 14\text{H}_2\text{O}$	Insoluble
Ferrocianuro de cobre (II)	$\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot \text{XH}_2\text{O}$	Insoluble
Ferricianuro de hierro (II)	$\text{Fe}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)_2$	Insoluble
Ferrocianuro de hierro (II)	$\text{Fe}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$	Insoluble
Ferrocianuro de hierro (III)	$\text{Fe}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)_3$	Insoluble

1.3.3. Toxicidad del cianuro

El cianuro, a pesar de ser un producto químico industrial indispensable, es conocido por sus características tóxicas potencialmente mortales. La toxicidad del cianuro depende básicamente de su forma química, su estabilidad y su biodisponibilidad (Kunz y Casey, 1980). La forma más tóxica es el cianuro libre (HCN y CN^-), y las menos tóxicas son los complejos cianuro-metálicos fuertes (Dubey y Holmes, 1995). Existen al menos tres mecanismos conocidos de toxicidad para el cianuro: la quelación con metales di- o tri-valentes en los sitios activos de las metaloenzimas, la reacción con bases de Schiff intermediarias para formar derivados de nitrilo estables y la formación de cianhidrinas por reacción con compuestos cetónicos (Solomonson *et al.*, 1981).

La principal metaloenzima afectada en los seres vivos es la citocromo *c* oxidasa, enzima aceptora de electrones, en última instancia, de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, esencial para la respiración celular. La inhibición de esta enzima bloquea la fosforilación oxidativa, disminuyendo la concentración de ATP en la célula y provocando la muerte celular (Donato *et al.*, 2007). El cianuro, también puede inhibir la actividad de al menos otras 13 enzimas, como la catalasa, la peroxidasa, la fosfatasa, la ribulosa-1,5-bisfosfato, etc (Vasil'ev *et al.*, 2007).

Diariamente los seres humanos tienen contacto directo con el cianuro o sus derivados a través de los alimentos que consumen y productos que utilizan. La causa principal de muerte por cianuro involucra la ingesta de plantas cianogénicas, cuyos niveles elevados de cianuro provocan una parálisis permanente de las extremidades. En humanos, la dosis letal de cianuro por ingestión o inhalación varía entre 50 y 200 mg (1 a 3 mg de cianuro libre por Kg de masa corporal). La dosis letal por absorción dérmica es

considerablemente mayor, alrededor de 100 mg por kg de masa corporal (Bhattacharya *et al.*, 2006, Logsdon *et al.*, 2006). El cianuro no se acumula ni se biomagnifica, por lo que exposiciones prolongadas a concentraciones subletales de cianuro no necesariamente causan intoxicación, aunque podrían provocar lesiones en el nervio óptico, ataxia, hipertensión, desmielinización, neuropatía óptica de Leber, bocio y disminución de las funciones tiroideas. No se conocen casos en los que el cianuro se relacione con cáncer o defectos congénitos, o que pueda tener efectos adversos sobre la reproducción (Logsdon *et al.*, 2006).

A nivel tisular, el cianuro actúa sobre el sistema respiratorio, impidiendo el uso del oxígeno mediante la inhibición de la acción de las enzimas respiratorias. La hipoxia citotóxica o asfixia celular provoca que el metabolismo cambie de aerobio a anaerobio, lo que conlleva a la acumulación de lactato en la sangre. El efecto conjunto de la hipoxia y la acidosis láctica provoca una depresión en el sistema nervioso central que puede causar paro respiratorio y resultar mortal. Además del sistema respiratorio, el cianuro también afecta al sistema cardiovascular, ocasiona un agrandamiento de la glándula tiroides y provoca irritación en ojos y piel. A altas concentraciones provoca convulsiones, presión sanguínea baja, ritmo cardíaco lento, pérdida de la conciencia, lesión en el pulmón y fallo respiratorio que lleva a la muerte.

Los humanos poseen diversos mecanismos para destoxificar el cianuro de forma efectiva, siempre que la concentración de cianuro no supere la dosis mínima letal. Uno de estos es la reacción del cianuro con el tiosulfato que produce tiocianato en una reacción catalizada por la enzima rodanasa. El tiocianato, que es menos tóxico que el cianuro, es liberado por la orina en cuestión de días. Otro mecanismo de destoxificación de cianuro en humanos es el que presenta la metahemoglobina, proteína que tiene más afinidad por el cianuro que la citocromo *c* oxidasa.

Otros animales, como peces e invertebrados marinos, son especialmente sensibles a la exposición al cianuro. Concentraciones de cianuro libre en el ambiente marino, que pueden oscilar entre 5 y 7 µg/L, reducen la movilidad e inhiben la reproducción de muchas especies de peces. Otros efectos adversos pueden ser mortalidad retardada, alteraciones osmorreguladoras y alteraciones del crecimiento. A concentraciones de 20 a 76 µg/L, el cianuro es mortal para una gran cantidad de especies marinas, y a concentraciones que superan los 200 µg/L el efecto tóxico es rápido.

1.3.4. El cianuro en la naturaleza

A pesar de que el cianuro es un compuesto altamente nocivo, este se produce y se elimina de forma natural por algunos seres vivos, alcanzándose así un equilibrio ambiental relativo. La producción biológica de cianuro tiene lugar durante la síntesis de etileno en plantas (Fig. 3) y ocurre a través de un proceso denominado cianogénesis (Raybuck, 1992; Siller y Winter, 1998; Campbell *et al.*, 2001). Además, este compuesto puede ser transformado por mecanismos de detoxificación biológica o asimilado como fuente de nitrógeno (Knowles, 1988; Kunz *et al.*, 1998).

En la naturaleza el cianuro es formado, excretado y degradado por miles de animales, plantas, insectos, hongos y bacterias. Los niveles de cianuro potencialmente liberado por la digestión o inadecuada preparación de plantas cianogénicas pueden llegar a concentraciones de cientos de partes por millón. La ingesta de estos vegetales puede originar la muerte en animales y el envenenamiento del ser humano (Askeland y Morrison, 1983). El cianuro presente en plantas cianogénicas como la yuca, el bambú o el sorgo, les confiere protección contra los depredadores (Nahrstedt, 1988; McAfee y Taylor, 1999; Vetter, 2000; Eisler, 2004).

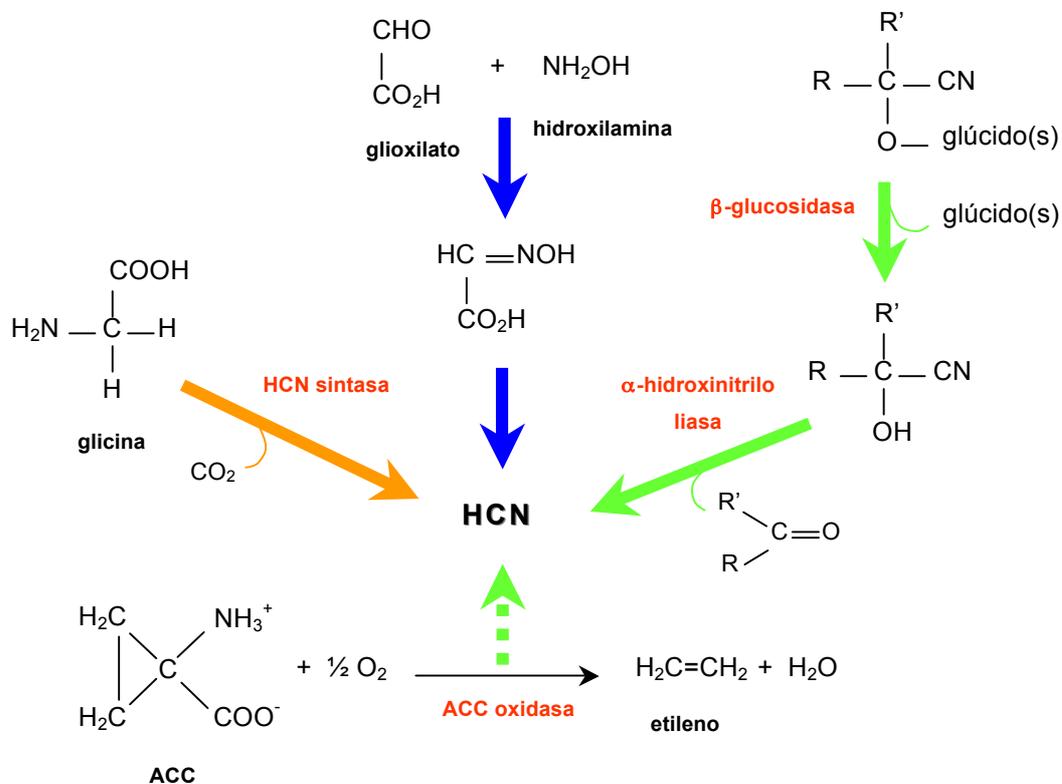


Figura 3: Cianogénesis. Las flechas representan las rutas de biosíntesis de cianuro en bacterias y hongos (naranja), en algas (azul) y en plantas y animales (verde continua). La flecha verde discontinua representa la producción de cianuro en plantas durante la síntesis de etileno a partir del ácido 1-amino-1-ciclopropilcarboxílico (ACC) (Luque-Almagro, 2005).

La degradación biológica de cianuro es debida a la capacidad de ciertos microorganismos, mayoritariamente bacterias, de utilizar compuestos cianurados como fuente de nitrógeno, convirtiendo un compuesto tóxico en sustancias inocuas como el amonio. Entre los microorganismos que poseen esta capacidad degradadora se encuentran muchos hongos y bacterias (Tabla 4). Las rutas metabólicas de asimilación de cianuro son diversas, aunque todas tienen en común la formación, en última instancia, de amonio (Tabla 4). Estas rutas, que se pueden clasificar en oxidativas, hidrolíticas, de sustitución/transferencia y reductivas, pueden transcurrir mediante la conversión directa de cianuro en amonio, o a través de intermediarios como la formamida, el cianato, el tiocianato, la cianoalanina o cianhidrinas (Dubey y Holmes, 1995; Raybuck, 1992; Ebbs, 2004).

Tabla 4: Rutas biológicas de degradación del cianuro

Ruta	Enzima	Microorganismo
Oxidativa	Cianuro monooxigenasa $\text{HCN} + \text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{NADPH} \rightarrow \text{HOCN} + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$	<i>Pseudomonas sp.</i>
	Cianasa $\text{HOCN} + \text{HCO}_3^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CO}_2 + \text{NH}_4^+ + 3\text{OH}^-$	<i>Escherichia coli</i> , <i>Rhodococcus rhodochrous</i>
	Cianuro dioxigenasa $\text{HCN} + \text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{NADPH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3 + \text{NADP}^+$	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas cereus</i> , <i>Bacillus pumillus</i> , <i>Escherichia coli</i> BCN6
Hidrolítica	Cianuro hidratasa $\text{HCN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCONH}_2$	Hongos patógenos, <i>Gloeocercospora sorghi</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> CCMI 876, <i>Fusarium solani</i> IHEM 8026, <i>Sternphylium loti</i>
	Cianidasa $\text{HCN} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_2\text{H} + \text{NH}_3$	<i>Alcaligenes xylosooxidans</i> , <i>Bacillus pumillus</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i>
	Nitrilasa $\text{R-CN} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-CO}_2\text{H} + \text{NH}_3$	<i>Klebsiella ozaenae</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Nocardia sp.</i> , <i>Rhodococcus rhodochrous</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>F. oxysporum</i>
	Nitrilo hidratasa $\text{R-CN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-CONH}_2$	<i>Pseudomonas</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Rhodococcus rhodochrous</i> , <i>Pseudonocardia thermophila</i> , <i>Pseudomonas marginales</i> MA32, <i>Pseudomonas putida</i> MA113, <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>Brevibacterium imperialis</i> CBS489-74

Sustitución/ transferencia	Rodanasa $\text{HCN} + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{HCNS} + \text{SO}_3^{2-}$	<i>Thiobacillus denitrificans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Ferrobacillus ferrooxidans</i> , <i>Thermobacillus denitrificans</i> , <i>Desulfotomaculum nitrificans</i> , <i>Fusarium sp.</i>
	Cianoalanina sintasa $\text{Cys} + \text{HCN} \rightarrow \beta\text{-cianoalanina} + \text{HS}^-$	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Enterobacter sp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>
Reductiva	Nitrogenasa $\text{HCN} + 6\text{H}^+ + 6\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_4 + \text{NH}_3$	<i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Rhodopseudomonas gelatinosa</i> , <i>Streptomyces thermoautotrophicus</i> , <i>Herbaspirillum seropedicae</i> , <i>Azospirillum sp.</i> , <i>Rhodospirillum rubrum</i>

1.3.5. El cianuro, un compuesto esencial en la minería y en el mundo moderno

El cianuro es uno de los principales compuestos utilizados por la industria química debido a su composición de carbono y nitrógeno, ambos elementos comunes, y a la facilidad con la cual reacciona con otras sustancias. Es un subproducto de la fabricación de fibras acrílicas, o bien es generado por la combinación de gas natural con amoníaco líquido. Su fabricación primaria es de 1,4 millones de toneladas y se produce principalmente en E.E.U.U., México, Singapur, China, Inglaterra, España y Alemania. La industria minera y del plástico en general consume el 82% del cianuro producido en el mundo, pero de dicho porcentaje tan solo un 18% es utilizado en minería y el otro 64% es utilizado en la industria para la fabricación de plásticos y derivados (Álvarez *et al.*, 2013).

Así, la mayoría del cianuro fabricado en el mundo se emplea en la producción de químicos orgánicos (nitrilo, nylon y plásticos acrílicos), la producción de goma sintética y en la cementación de aceros. El ácido cianhídrico (HCN) se ha utilizado ampliamente para exterminar a los roedores y depredadores grandes, y en la práctica hortícola, para controlar las plagas de insectos que han desarrollado resistencia a otros pesticidas. Además, el cianuro se utiliza en productos farmacéuticos y en vendas quirúrgicas que promueven la cicatrización.

En otros sectores industriales, el cianuro se empleado en la producción de papel, textiles y plásticos. Las sales de cianuro son utilizadas en la metalurgia para galvanización, limpieza de metales y la recuperación del oro del resto de material reutilizado. El gas cianhídrico se utiliza para exterminar plagas e insectos en barcos y edificios. Las

sustancias químicas encontradas en productos hechos con acetonitrilo, utilizados para remover uñas postizas, pueden producir cianuro si se ingieren accidentalmente.

Además, este compuesto está presente en gran parte del entorno diario al que estamos expuestos, por ejemplo, en la sal usada para derretir el hielo en los caminos y en los escapes de los automóviles. También es un estabilizante de la sal de mesa. También se encuentra en el humo de los cigarrillos y en los productos de combustión de los materiales sintéticos como los plásticos y que se desprenden al quemar un material.

El ferrocianuro de potasio ($K_4[Fe(CN)_6]$) se utiliza en algunas industrias de la alimentación como la vitivinícola, para la eliminación de los metales pesados que se encuentran en el vino. Estos metales pueden provenir de la propia producción de uva (pesticidas, derrames, desechos industriales) así como también de la maquinaria que se utiliza provocando enturbiamientos, ya que el mosto y el vino atacan, carcomen y disuelven los metales.

Desde finales del siglo XIX, el cianuro sódico es empleado intensamente para la disolución o lixiviación de oro y plata. Del total de la producción mundial de cianuro, alrededor del 20% se utiliza para fabricar cianuro sódico, una forma sólida de cianuro cuya manipulación es relativamente fácil y segura. De este porcentaje, el 18% se utiliza en minería en todo el mundo, mayormente para la recuperación de oro y plata.

Uno de los métodos más utilizados para la extracción de oro y plata es el de cianuración que consiste en la extracción de metales preciosos a partir de un mineral molido en una solución alcalina diluida con cianuro. A pesar de los problemas ambientales que presenta el uso del cianuro y de la gran cantidad de investigaciones sobre otros procesos de disolución menos contaminantes, actualmente, se sigue utilizando ampliamente debido a su bajo coste y a su simplicidad. Los procesos de extracción empleados en operaciones mineras requieren soluciones muy diluidas de cianuro de sodio, generalmente entre 0.01% y 0.05% de cianuro (100 a 500 partes por millón). En contacto con el oro o la plata, el cianuro forma complejos estables, razón por la cual su importancia en la minería. Como resultado del proceso de cianuración, de la degradación natural de los efluentes del proceso o del tratamiento químico de éstos, se forman diversos compuestos solubles relacionados con el cianuro, entre los que figuran, además del cianuro libre y de los complejos metálicos de cianuro, el tiocianato, el cianato y el amoníaco. Todos estos

compuestos son importantes, tanto desde el punto de vista toxicológico como desde el punto de vista de su tratamiento.

1.3.6. Descontaminación de residuos industriales cianurados

Fundamentalmente, los residuos industriales que contienen cianuro son tratados mediante métodos físico-químicos, sin embargo estos tienen una serie de limitaciones que hacen poco aconsejable su uso. Como alternativa, los métodos basados en microorganismos capaces de utilizar el cianuro como fuente de nitrógeno pueden suponer una forma ecológica, económica y eficiente de eliminación de cianuro.

1.3.6.1. Descomposición fotoquímica del cianuro

Depende de la exposición del compuesto cianurado a la radiación ultravioleta, esta es lenta en aguas profundas, turbias o a la sombra. En residuos sólidos se requieren grandes extensiones para que estos sean poco profundos y la luz los traspase. En la oxidación fotocatalítica, se combina la energía radiante de la luz ultravioleta y un oxidante como el aire en presencia de un semiconductor como el dióxido de titanio, un compuesto extremadamente estable en suspensiones acuosas. La actividad fotocatalítica del dióxido de titanio ha sido ampliamente estudiada y su aplicabilidad en los procesos solares fotocatalíticos se debe al hecho de que absorbe los fotones disponibles en un intervalo de longitud de onda de 300 a 400 nm. El mecanismo de oxidación fotocatalítica no ha sido determinado con precisión, pero se ha evidenciado la conversión completa de CN^- a CNO^- y la posterior formación de NO_3^- , CO_2 y H_2O_2 (Bartosz *et al.*, 2002; Kuhn y Young, 2005).

1.3.6.2. Degradación físico-química del cianuro

Los efluentes industriales mineros contienen concentraciones de cianuro total entre 0,1 y 100 mg/L, mientras que en efluentes de industrias galvanoplásticas pueden encontrarse concentraciones de cianuro entre 0,1 y 1 000 mg/L (Patil y Kulkarni, 2008). Actualmente, existen muchos tratamientos químicos para los residuos cianurados, como cloración alcalina, ozonización, precipitación, acidificación, oxidación electrolítica, peróxido de hidrógeno, absorción con carbón activado, ósmosis reversa, hidrólisis térmica y el proceso INCO con

SO₂/aire (Botz *et al.*, 2005). En la tabla 5 se describen brevemente los principales tratamientos físico-químicos que se emplean para la eliminar el cianuro del ambiente.

Tabla 5: Principales tratamientos físico-químicos para la eliminación del cianuro. WAD, complejos cianuro-metálicos fácilmente disociables y SAD, complejos cianuro-metálicos difícilmente disociables (Dash *et al.*, 2009)

Tratamiento	Ventaja	Desventaja	CN ⁻ libre	Remueve			¿Requiere tratamiento adicional?
				Tiocianato	Cianuro WAD	Cianuro SAD	
Fotólisis	Proceso efectivo. No se producen productos indeseables. Remoción completa	Requiere alta energía. Dificultad para operar. Muy costoso	Si	Si	Si	Si	Si
Clorinación alcalina	Tecnología establecida. El cianuro se oxida a CO ₂ y N ₂ a pH bajo. Remueve metales por precipitación a pH elevados	Se adicionan cationes/aniones al agua. Exceso de hipoclorito tóxico. La clorinación puede reaccionar con compuestos orgánicos. Genera productos tóxicos intermediarios	Si	Si	Si	No	Si
Peróxido de hidrogeno	El exceso se descompone a H ₂ O y O ₂ . Simple de operar. No reacciona con el tiocianato	Costoso. Puede precipitar si precipitan ferricianuros con cobre. Requiere dosis exactas	Si	No	Si	Algo	Si
SO ₂ /aire (INCO)	El reactivo es barato. Se usa sobre un amplio rango de pH	Agrega sulfatos al proceso. Puede precipitar si precipitan ferricianuros con cobre	Si	Algo	Si	Si	Poco
Ozonización	Es posible alguna regeneración del cianuro	Produce amonio. Altamente costoso	Si	Si	Si	No	Si
Oxidación anódica	Trata todos los efluentes sin importar su concentración	Requiere tratamiento adicional por oxidación	Si	Si	Si	No	Si
Electrodialisis	Altamente eficiente	Muy costoso. Aplicable a cierto tipo de efluentes	Si	Si	Si	Si	No
Ósmosis reversa	Tratamiento eficiente	Costoso. Aplicable a cierto tipo de efluentes	Si	Si	Si	Si	No
Hidrólisis	Metodología simple	Se requieren altas temperaturas. Produce HCN. Requiere mucho ácido	Si	No	No	No	Si
Carbón activado	Método muy efectivo	Costoso. Solo para bajas concentraciones. Se requiere pre-tratamiento	No	Algo	Mucho	Si	Poco
Resina	Eficiente	Se requiere pre-tratamiento. Difícil de sustituir	Algo	Algo	Si	Si	Poco

1.3.6.3. Degradación biológica de cianuro

La degradación biológica del cianuro es una opción muy ventajosa a los procedimientos físico-químicos mostrados en el apartado anterior. Los métodos biológicos, y particularmente los microbiológicos, son alternativas eficientes, porque son específicos, respecto a los focos en los que se pretende que actúen y luego de estandarizarse, pueden resultar muy económicos, respecto a los procesos químicos (Akciil, 2003). Otra ventaja de estos procesos es su diseño simple y el control que se posee del proceso operativo, los bajos costos de las sustancias químicas y la capacidad de tratar por este método todas las formas de cianuro y sus subproductos (Dumestre *et al.*, 1997; Oudjehani *et al.*, 2002; Akciil y Mudder, 2003; Roshan *et al.*, 2007). En la tabla 6 se resumen los beneficios y aplicaciones del tratamiento biológico.

Tabla 6: Ventajas y desventajas de la degradación biológica del cianuro (Dash *et al.*, 2009)

Tratamiento	Ventaja	Desventaja	CN ⁻ libre	Elimina			¿Requiere tratamiento adicional?
				Tiocianato	Cianuro WAD	Cianuro SAD	
Oxidación biológica / Biodegradación	Aprovecha un proceso natural. Puede tratar CN ⁻ sin generar otro tipo de desecho. No requiere el uso de químicos o controles extensos. El costo es fijado por el volumen a tratar. Es amigable con el ambiente	La tecnología no está totalmente establecida. Requiere la combinación de la metalurgia, biología y procesos de ingeniería. Se requieren evaluaciones y estudios específicos para cada tipo y sitio. No remueve concentraciones altas	Si	Si	Si	Si	No

Las transformaciones biológicas incluyen procesos de biodegradación y asimilación del cianuro en forma de aminoácidos, tiocianato, β -cianolanina y vitaminas por plantas y microorganismos (Gupta *et al.*, 2010). La biodegradación hace referencia a las reacciones que convierten el cianuro en moléculas orgánicas o inorgánicas más simples, las cuales pueden ser fácilmente metabolizadas hasta amonio y dióxido de carbono o metano. Las vías de biodegradación son utilizadas principalmente por organismos procariotas y probablemente representan una de las primeras respuestas evolutivas a la presencia de

cianuro en el ambiente. La asimilación hace referencia a la metabolización del cianuro e incorporación de sus derivados en compuestos orgánicos. Las vías de asimilación están presentes tanto en procariotas como en eucariotas (Dzombak *et al.*, 2006). Actualmente, se pueden encontrar numerosas referencias bibliográficas respecto a un gran número de investigaciones sobre degradación microbiana del cianuro y derivados (Tabla 7).

Tabla 7: Investigaciones sobre la degradación de cianuro (Dash *et al.*, 2009)

Compuesto a ser eliminado	Microorganismo	Parámetros dependientes			Referencias
		Concentración	pH	T (°C)	
Cianuro WAD	<i>Pseudomona sp.</i> (CM5, CMN2)	100-400 mg/L	9,2-11,4	30	Akcil <i>et al.</i> , 2003
Cianuro de Potasio	<i>Fusarium solani</i>	0,5-0,8 mM	9,2-10,7	30	Dumestre <i>et al.</i> , 1997
Complejo cianuro ferroso (II)	<i>Pseudomona fluorescens</i>	-	4,0-7,0	25-35	Dursun y Akzu, 2000
Complejo cianuro ferroso (II)	<i>P. fluorescens</i>	100 mg/L	5,0	25	Dursun <i>et al.</i> , 1999
Cianuro de Potasio	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,58 mM	7,0	30	Kao <i>et al.</i> , 2003
Nitrilos	<i>K. oxytoca</i>	25-100 mM	7,0	30	Kao <i>et al.</i> , 2006
Cianuros	Cultivo mixto	20 mg/L	7,0	22	White <i>et al.</i> , 1998
Cianuro de Sodio	<i>Pseudomona putida</i> inmovilizada	100-400 mg/L	6,7	25	Babu <i>et al.</i> , 1992
Cianuro de Sodio, cianatos y tiocianatos	<i>P. putida</i> inmovilizada	4 mM	7,5	25	Chapatwala <i>et al.</i> , 1998
Cianuro y formamida	<i>Fusarium oxyporum</i> inmovilizada	1-7 mM	8,0	25-30	Campos <i>et al.</i> , 2006
Cianuro metálico	<i>Trichoderma sp.</i>	2000 mg/L	6,5	25	Ezzi-Mufaddal y Lynch, 2002
Cianuro de cobre y zinc	<i>Citrobacter sp.</i> , <i>Pseudomona sp.</i>	52 mg/L	7,5	35	Patil y Paknikar, 2000
Tetra-ciano-nichelato (II)	<i>P. fluorescens</i> inmovilizada	26 mg/L	-	30	Suh, 1994
Cianuro de Potasio	<i>Burkholderia Capita cepa C-3</i>	10 mM	8,0-10,0	30	Adjei y Ohta, 2000
Cianuro de Potasio	<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	-	Castric y Strobel, 1969
Cianuro de Potasio	<i>Bacillus pumillus C1</i>	100 mg/L	10,5	30	Meyers <i>et al.</i> 1991
Cianuro de Potasio	<i>Escherichia coli</i> BCN6	50, 100, 200 mg/L	9,2	30	Figueira <i>et al.</i> , 1996
Cianuro de Potasio	<i>Stemphilium loti</i>	2 mM	6,5-7,5	25	Fry y Millar, 1972
Cianuro de Potasio	<i>P. acidovorans</i>	31 mg/L	7,1; 7,9 y 9,1	30	Shivaraman y Parhad, 1991
Cianuro de Potasio	<i>P. stutzeri</i> AK61	1 mM	7,6	30	Watanabe <i>et al.</i> , 1998
Cianuro de Sodio	<i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344	2 mM	9,5	30	Luque-Almagro <i>et al.</i> , 2005a, b
Tetra-ciano-nichelato (II)	<i>Cryptococcus humicolus</i> MCN2	51 mM	7,5	25	Kwon <i>et al.</i> , 2002

1.4. *Pseudomonas*, UN GÉNERO CON GRAN CAPACIDAD DEGRADADORA

El género *Pseudomonas* fue descrito por el profesor Migula (Karlsruhe Institute, Alemania) como "células con estructuras polares móviles" (Migula, 1894; Migula, 1900). *Pseudomonas* literalmente significa «falsa unidad», derivado del griego pseudo (ψευδο 'falso') y monas

(μονάς / μονάδα 'una sola unidad'). Debido a la amplia distribución de la familia *Pseudomonadaceae* en la naturaleza, esta fue descrita en los inicios históricos de la microbiología. El nombre genérico *Pseudomonas* estaba definido inicialmente en términos relativamente vagos, describiéndose como un género de bacterias Gram negativas y bacilos con flagelo polar. Poco después, un gran número de especies aisladas de un variado número de nichos ecológicos fueron asignados al género *Pseudomonas*. Las nuevas metodologías basadas en análisis de macromoléculas conservadas entre diversos organismos, han reclasificado a muchas de estas especies.

Actualmente el género *Pseudomonas* se define como bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, oxidasa positivos y aeróbicos, aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. Los miembros de este género generalmente son móviles gracias a uno o más flagelos polares que poseen, son catalasa positivos y no forman esporas. Algunos miembros del género son psicrófilos, mientras que otros sintetizan sideróforos fluorescentes de color amarillo-verdoso con gran valor taxonómico. Existen especies de *Pseudomonas* típicamente hemolíticas (en agar sangre), prueba del indol negativas, rojo de metileno negativas y Voges Proskauer negativas. Algunas especies sintetizan una cápsula de exopolisacáridos que facilita la adhesión celular, la formación de biopelículas y protege de la fagocitosis, de los anticuerpos o del complemento, aumentando así su posible patogenicidad (Palleroni, 2010).

Las especies del género *Pseudomonas* son organismos ubicuos que se han aislado tanto en suelos limpios como en suelos contaminados por productos biogénicos o xenobióticos. También son predominantes en la rizosfera y en la filosfera de plantas y se han aislado de ambientes acuáticos, tanto de agua dulce como de aguas marinas. En general son bacterias inocuas para el hombre, aunque también existen patógenos oportunistas como *P. aeruginosa* y patógenos de animales o plantas como *P. syringae*.

Este género es uno de los más proclives a la degradación de compuestos orgánicos potencialmente tóxicos, especialmente cepas de la especie *Pseudomonas putida*. El amplio potencial catabólico de los componentes del género viene dado en muchos casos por la presencia de determinantes plasmídicos y transposones autotransmisibles. La ubicuidad de las bacterias del género *Pseudomonas* y su capacidad para explotar una amplia variedad de nutrientes refleja un sistema de adaptación al medio ambiente que no se encuentra en otros géneros bacterianos. Las cepas del género *Pseudomonas* son capaces de procesar,

integrar y reaccionar a una amplia variedad de condiciones cambiantes en el medio ambiente, y muestran una alta capacidad de respuesta a señales físico-químicas y biológicas (Timmis, 2002). Se han descrito cepas capaces de adquirir resistencia a metales pesados, disolventes orgánicos y detergentes, lo cual les permite explotar una amplia gama de fuentes de carbono como nutrientes, así como colonizar ambientes y nichos que difícilmente son colonizables por otros microorganismos. Por ello, no es sorprendente que se considere a los miembros del género *Pseudomonas* un paradigma de versatilidad metabólica, así como microorganismos clave en el reciclado de materia orgánica en los compartimentos aeróbicos de los ecosistemas, jugando, por tanto, un papel esencial en la mejora y el mantenimiento de la calidad medioambiental. Además de su uso en biodegradación, las especies del género *Pseudomonas* se emplean en distintos procesos industriales, como la fabricación de bioplásticos o en técnicas de biocontrol (Jiménez *et al.*, 2004).

1.4.1. *Pseudomonas pseudoalcaligenes*

Pseudomonas pseudoalcaligenes es una bacteria del suelo, aislada por primera vez a partir del agua de una piscina (Monias, 1928). Basándose en el análisis del rRNA 16S esta especie se ha clasificado en el mismo grupo que *P. aeruginosa*, *P. mendocina* y *P. stutzeri*, y se incluye en el subgrupo de *P. aeruginosa* de Palleroni (Anzai *et al.*, 2000). Etimológicamente *pseudoalcaligenes* significa "falso productor de álcalis". Esta especie está constituida por tres subespecies: *P. pseudoalcaligenes subsp. Pseudoalcaligenes* (Stanier *et al.*, 1966), *P. pseudoalcaligenes subsp. citrulli*, patógena de plantas (Schaad *et al.*, 1978) y *P. pseudoalcaligenes subsp. konjaci* (agente causal de la enfermedad bacteriana del tubérculo japonés *Amorphophalus konjaci*, y descrita por Goto en 1983). Algunas cepas de *P. pseudoalcaligenes*, aisladas de suelos y aguas subterráneas contaminadas, son capaces de utilizar el nitrobenzeno como única fuente de carbono, nitrógeno y energía (Nishino y Spain, 1993), de cometabolizar bifenilos policlorados (Taira *et al.*, 1992), de crecer en presencia de telurito (di Tomaso *et al.*, 2002), de tolerar metales tóxicos y metaloides (Tremaroli *et al.*, 2010), y de utilizar cianuro como fuente de nitrógeno (Luque-Almagro *et al.*, 2005a, b).

1.4.2. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

La estirpe *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 fue aislada a partir de lodos recogidos de la margen izquierda del río Guadalquivir, tras su paso por la ciudad de Córdoba, por su capacidad de utilizar cianuro como única fuente de nitrógeno (Luque-Almagro *et al.*, 2005a, b). El metabolismo del cianuro ha sido ampliamente estudiado en esta bacteria, siendo su principal peculiaridad su carácter alcalófilo. El crecimiento bacteriano en medios alcalinos evita que el cianuro se volatilice como HCN. Esta característica, así como su capacidad de asimilar complejos cianuro-metálicos, nitrilos y otros derivados cianurados como el cianato, hacen de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 un candidato idóneo para su aplicación biotecnológica en el tratamiento de residuos industriales cianurados. Además, su potencial biotecnológico ha quedado demostrado mediante la descontaminación de cianuro en un reactor discontinuo (Huertas *et al.*, 2010), y también mediante la aplicación de la enzima cianasa de este microorganismo en la construcción de un biosensor de cianato (Luque-Almagro *et al.*, 2003).

Frente a la presencia de cianuro, esta bacteria desarrolla una compleja respuesta que implica la inducción de enzimas de degradación de cianuro y cianato, como la nitrilasa NitC y la cianasa CynS, respectivamente, la inducción de una oxidasa terminal insensible a cianuro (CioAB), y de mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo y de control del balance C/N intracelular en respuesta a la limitación de nitrógeno (Luque-Almagro *et al.*, 2005a, b); Huertas *et al.*, 2006; Luque-Almagro *et al.*, 2007; Quesada *et al.*, 2007). A pesar de la inducción de la cianasa por cianuro, posteriormente se ha demostrado que la cianasa no participa en la ruta de asimilación de cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2008).

P. pseudoalcaligenes CECT5344 ha sido la primera bacteria cianotrofa cuyo genoma ha sido secuenciado en su totalidad (Luque-Almagro *et al.*, 2013; Wibberg *et al.*, 2014). Su genoma, de 4,64 Mb, consta de un único cromosoma circular, comparte el 75% de sus genes (3 191) con *P. mendocina* Ymp y no contiene plásmidos accesorios. La secuenciación del genoma de este organismo ha permitido identificar la presencia de genes implicados en procesos con gran potencial biotecnológico, como la resistencia y asimilación de cianuro, el metabolismo de bioplásticos, la degradación de furfurales y otros contaminantes, o la resistencia a metales pesados (Luque-Almagro *et al.*, 2013).

1.5. HOMEOSTASIS DEL HIERRO EN BACTERIAS

El hierro es un micronutriente esencial para los seres vivos, ya que gracias a sus propiedades redox actúa como cofactor de muchas enzimas. A pesar de ser un elemento abundante en nuestro planeta, su biodisponibilidad es baja, ya que si bien en condiciones reductoras o de anaerobiosis predomina el Fe^{2+} , a pH neutro y en presencia de oxígeno este se oxida rápidamente a Fe^{3+} y forma compuestos insolubles que no pueden pasar al interior celular. A pesar de ser un metal indispensable, en condiciones aeróbicas, una alta concentración de hierro puede resultar tóxica para los seres vivos, ya que mediante las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss (Fig. 4) el hierro genera especies reactivas de oxígeno (ROS), como el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y peróxidos (RO_2) que contribuyen a la generación de estrés oxidativo (Toutati, 2000). Estas ROS pueden dañar lípidos, proteínas y DNA por oxidación, por lo que la célula debe eliminarlas antes de que causen daños significativos (Hansberg, 2002).

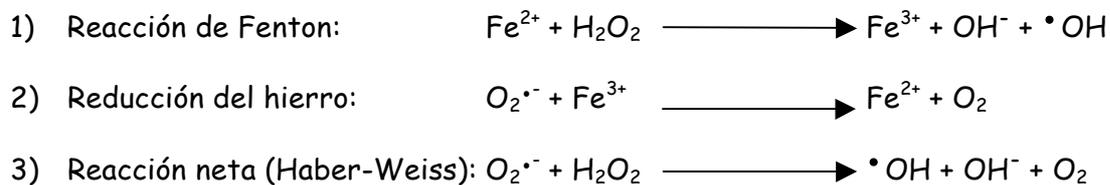


Figura 4: Reacciones químicas que involucran al hierro en la formación de especies reactivas de oxígeno (Andrews *et al.*, 2003)

En la reacción de Fenton se forma el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) que está considerado como el radical más reactivo en los sistemas biológicos. Su interacción con los ácidos grasos poliinsaturados que componen los fosfolípidos de las membranas produce un daño oxidativo celular que disminuye la fluidez de las membranas y llega incluso a causar la lisis de las células (Hansberg, 2002; Barbusiński, 2009).

Frente a esta dualidad del hierro, los seres vivos deben mantener un estricto control de los niveles intracelulares de hierro. Si estos son suficientes para cubrir los requerimientos de la célula, se reprimen los sistemas de captación del metal y se promueve su almacenamiento y utilización. Si el hierro es escaso, se promueve la expresión de receptores y transportadores, para así lograr una mayor entrada del metal en las células

(Bereswill *et al.*, 2000; Ollinger *et al.*, 2006). En bacterias, estas funciones suelen ser desempeñadas por reguladores transcripcionales como Fur (Ferric uptake regulator) en Gram negativas o DtxR (represor de la toxina de la difteria) en Gram-positivas, que operan simultáneamente como sensores citoplasmáticos de hierro y como efectores de respuesta, controlando la expresión de un gran número de genes diana, entre los que se encuentran los encargados de la captación del metal.

Para la captación de Fe^{3+} , las bacterias secretan compuestos quelantes de hierro de alta afinidad llamados sideróforos. De acuerdo a los grupos funcionales que usan como ligando para coordinar el Fe^{3+} , estos se clasifican en tres categorías: hidroxamatos, α -hidroxiácidos y catecolatos cíclicos o lineales (Wandersman y Delepelaire, 2004). En bacterias Gram negativas, la captación de ferri-sideróforos ocurre a través de receptores específicos de la membrana externa, cuya expresión por lo general se induce frente a la escasez de hierro. Tras la unión del ferri-sideróforo, el receptor de la membrana externa sufre un cambio conformacional que se refleja en su porción periplásmica, la cual interactúa con la proteína TonB, parte del complejo proteico TonB-ExbD-ExbB. Una vez en el periplasma, el ferri-sideróforo es captado por proteínas periplásmicas de unión a sideróforos y es llevado al citoplasma por medio de transportadores tipo ABC asociados a la membrana interna. Se cree que en el citoplasma ocurre una reducción del Fe^{3+} , de manera que el Fe^{2+} se disocia del sideróforo como consecuencia de la baja afinidad que tiene el compuesto quelante por este ión. Existen varias enzimas con actividad férrico-reductasa, pero no se ha esclarecido su función en este proceso (Andrews, 1998).

En el caso del Fe^{2+} , su captación se realiza a través de sistemas tipo Nramp (transportadores de iones metálicos divalentes en bacterias, levaduras, algas, plantas y animales), como MntH (Makui *et al.*, 2000; Kehres *et al.*, 2002) y permeasas tipo ABC, como SitABCD (Zaharik *et al.*, 2004; Sabri *et al.*, 2006); pero principalmente por medio del sistema FeoAB (Hantke, 2003). El modelo de transporte de Fe^{2+} a través de este último sistema sugiere que el metal entra en el periplasma a través de una porina, y es translocado al citoplasma por la proteína de membrana FeoB, que interactúa con FeoA en el citoplasma (Marlovits *et al.*, 2002). En γ -proteobacterias existe, de forma exclusiva, un gen adicional que acompaña a *feoA* y *feoB*, denominado *feoC*. Su proteína posee un dominio de unión a DNA, por lo que se cree podría ser un regulador transcripcional que ejerce un control

directo sobre la transcripción de *feoABC*. Los tres genes que conforman este sistema están reprimidos por Fur (Cartron *et al.*, 2006).

En bacterias, el regulador transcripcional Fur es el principal responsable de mantener la homeostasis de hierro. Identificado inicialmente en *E. coli*, este regulador transcripcional ha sido caracterizado en una gran cantidad de bacterias Gram negativas (Friedman y O'Brian, 2004) y algunas Gram positivas (Ledala *et al.*, 2007). Fur es un regulador que une Fe^{2+} , dimeriza a través de su dominio C-terminal, y se une al DNA por su dominio N-terminal (Tiss *et al.*, 2005). Si las cantidades de hierro sobrepasan un determinado umbral, Fur es un represor que se activa debido a un cambio conformacional que induce la unión del metal a la proteína. En su forma activa Fur se une al promotor de sus genes diana, aquellos que poseen una secuencia denominada caja Fur, impidiendo así la unión de la RNA polimerasa.

Ensayos de FURTA (Fur Titration Assay) en *E. coli* han permitido identificar un gran número de genes regulados por Fur e implicados en el transporte de hierro al interior celular (Stojiljkovic *et al.*, 1994). Entre ellos se incluye el sistema de síntesis *entDFCEBA* (Pickett *et al.*, 1984) y transporte *fepAB*, *fes* y *fepCDG* (Chenault y Earhart, 1991) de enterobactina, el sistema de transporte de ferricromo *fhuACDB* (Fecker y Braun, 1983), los sistemas de transporte *cir* y *fiu* para los productos de la degradación de enterobactina (Nau y Konisky, 1989; Hantke, 1990), el receptor de membrana FhuE (Sauer *et al.*, 1990), el sistema de transporte de los complejos de Fe^{3+} -dicitrato *fecIRABCD* (van Hove *et al.*, 1990) y las proteínas ExbB, ExbD y TonB (Postle y Good, 1983; Eick-Helmerich y Braun, 1989), implicadas en el transporte a través de la membrana externa de los complejos de Fe^{3+} al periplasma (Stojiljkovic *et al.*, 1994).

Además de este mecanismo, existen evidencias de que Fur también puede actuar como represor sin estar unido al Fe^{2+} (Ernst *et al.*, 2005a,b). Por otra parte, en algunas bacterias Fur actúa como activador de manera similar a su modo de acción clásico, provocando un aumento en la expresión del gen diana (Delany *et al.*, 2004), o incluso de manera indirecta a través de la represión del pequeño RNA *ryhB*, el cual reprime la expresión de proteínas que utilizan hierro (Massé y Gottesman, 2002).

El gen *dapA* sintetiza la dihidrodipicolinato sintasa (EC 4.2.1.52), enzima que actúa en el primer paso de la biosíntesis de lisina (Fig. 5), aminoácido esencial para la vida de la bacteria (Maringanti e Imlay, 1999).

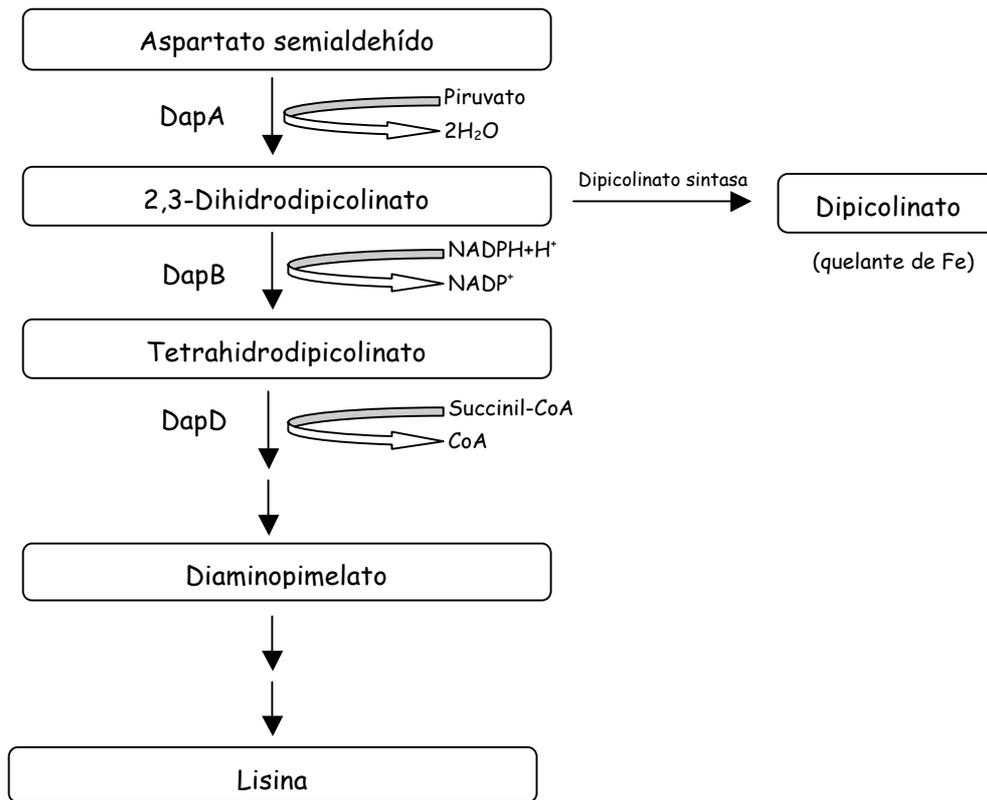


Figura 5: Ruta de biosíntesis de la lisina y del dipicolinato

Una mutación en el gen *dapA* impide la síntesis del ácido dihidrodipicolínico, el cual, por la acción de la dipicolinato sintasa, produce ácido dipicolínico (Fig. 6). Este compuesto es un excelente quelante de hierro (Levefaudes *et al.*, 2015).

En las bacterias hay tres clases de proteínas encargadas del almacenamiento de hierro: las ferritinas (Ftn; también presentes en eucariotas), las bacterioferritinas (Bfr), que contienen hemo y sólo se encuentran en el dominio *Bacteria*, y unas proteínas de pequeño tamaño, denominadas Dps, que son propias de procariotas (Andrews, 1998).

Estos tres tipos de proteínas pueden coexistir en una misma bacteria y se caracterizan por presentar subunidades idénticas, 24 las ferritinas y bacterioferritinas y 12 las Dps. Estas subunidades se unen para formar una proteína aproximadamente esférica con una cavidad central que actúa como reservorio y almacén de hierro. Cada subunidad se pliega formando una protuberancia de 4 α -hélices. La ferritina y la bacterioferritina, de unos 500 kDa, pueden acumular como mínimo de 2 000 a 3 000 átomos de hierro por molécula, mientras que las Dps, de unos 250 kDa, acumulan solamente unos 500 átomos de hierro (Liu *et al.*, 2016)

1.6. ESTRÉS OXIDATIVO EN BACTERIAS

La vida en condiciones aeróbicas tiene como consecuencia inevitable la producción de formas parcialmente reducidas de oxígeno denominadas especies reactivas del oxígeno (ROS), que debido a su alta reactividad y poder oxidante resultan nocivas para la célula (Sies, 1991). Estas ROS (Fig. 6) incluyen el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo ($\bullet OH$). En el caso del radical hidroxilo, a pesar de que su difusión dentro de la célula es limitada, puede reaccionar con la mayoría de biomoléculas e inactivarlas. El H_2O_2 es menos reactivo que el $\bullet OH$ debido a la estabilidad de su enlace oxígeno-oxígeno, mientras que el $O_2^{\bullet-}$ tiene una carga negativa que le impide atravesar membranas las y oxidar moléculas ricas en electrones (Imlay y Linn, 1987; Imlay, 2003). Por estos motivos la toxicidad del H_2O_2 y del $O_2^{\bullet-}$ es menor que la del $\bullet OH$. El oxígeno también puede reaccionar con radicales como el óxido nítrico (NO) y generar peroxinitrito ($OONO^-$), un precursor de otros potentes oxidantes que reciben el nombre de especies reactivas de nitrógeno (Beckman, 1996). Por este motivo, la generación de ROS suele ir asociada a la producción de especies reactivas de nitrógeno.

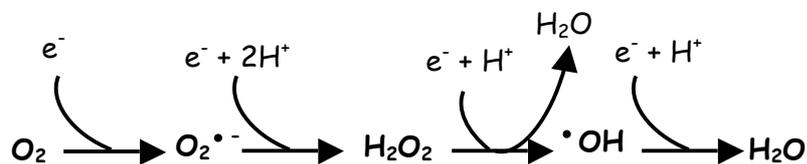


Figura 6: Principales especies reactivas de oxígeno (ROS). A partir de la reducción parcial del oxígeno molecular (O_2) se forma el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$).

El O_2 tiene poca afinidad por el primer electrón a captar, por lo que sólo reacciona con aquellos transportadores de electrones en los cuales los estados de oxidación univalentes sean estables. En los sistemas biológicos, los candidatos más probables son los centros sulfo-férricos (Fe-S), grupos hemo, quinonas y flavinas, que al transferir electrones de forma univalente son capaces de ceder ese primer electrón al O_2 . Estos grupos se encuentran principalmente a nivel de la cadena respiratoria de procariontas y eucariontas, lo que la convierte en una de las principales fuentes intracelulares de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 .

Análisis llevados a cabo *in vitro* e *in vivo* con la cadena respiratoria de *Escherichia coli* indican que $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 son generados principalmente por la autooxidación de deshidrogenasas reducidas (Messner e Imlay, 2002). La NADH deshidrogenasa II es la principal fuente de $O_2^{\cdot-}$, mientras que la NADH deshidrogenasa I, el homólogo bacteriano del complejo I mitocondrial, contribuye en menor medida a su producción. La enzima succinato deshidrogenasa, así como su isoforma sintetizada en condiciones anaeróbicas, fumarato reductasa, son también generadoras de $O_2^{\cdot-}$. Estas enzimas contienen flavinas que se reducen y transfieren un electrón al siguiente componente de la cadena respiratoria que puede contener un grupo sulfoférico o una quinona. Sin embargo, y debido a que las flavinas se encuentran accesibles en la superficie de la proteína, el O_2 puede interaccionar con la forma reducida de la flavina antes de que ésta transfiera los electrones al siguiente transportador y ser reducido a $O_2^{\cdot-}$. En muchos casos puede transferirse un segundo electrón al $O_2^{\cdot-}$ antes de que éste abandone el sitio activo, produciéndose H_2O_2 (Messner e Imlay, 2002).

A partir del $O_2^{\cdot-}$ generado a nivel de la cadena de transporte electrónica, por dismutación espontánea o catalizada por la enzima superóxido dismutasa, se genera H_2O_2 , que en presencia de iones metálicos como Fe^{2+} o Cu^+ puede reducirse y formar el radical $\cdot OH$ por la reacción de Fenton. El $O_2^{\cdot-}$ potencia la producción de radicales $\cdot OH$, ya que puede actuar como fuente de electrones para la reducción de los iones metálicos.

1.6.1. Efectos nocivos de las especies reactivas de oxígeno (ROS)

Niveles elevados de ROS son perjudiciales para la célula debido a que pueden reaccionar con biomoléculas como lípidos, ácidos nucleicos y proteínas e inactivar su función. La más reactiva de estas ROS es el radical $\cdot OH$, un poderoso oxidante que, aunque de difusión celular limitada, puede dañar la mayoría de los compuestos orgánicos (Czapski, 1984). Este radical $\cdot OH$ puede atacar directamente los lípidos de membrana, iniciando su peroxidación, proceso que tiene como consecuencia la disminución en la fluidez de la membrana y, con ello, la alteración de sus propiedades e interacción con proteínas. Además, durante este proceso de peroxidación se generan productos de degradación (por ejemplo, aldehídos), altamente reactivos que pueden dañar otras moléculas como proteínas. Sin embargo, una de las dianas más importantes del $\cdot OH$ es el DNA, ya que éste es capaz de unir iones metálicos como

hierro que favorecen la producción de este radical libre mediante la reacción de Fenton (Rai *et al.*, 2001). El radical $\cdot\text{OH}$ generado puede atacar tanto la base nitrogenada como el azúcar (deoxirribosa) de la molécula de DNA, produciendo roturas en una o ambas cadenas del ácido nucleico, aductos entre la base nitrogenada y el azúcar, y uniones covalentes con proteínas con las que está interaccionando. Todas estas modificaciones pueden resultar en mutagénesis o en un bloqueo del proceso de replicación del DNA (Sies y Menck, 1992; Sies, 1993).

El efecto más nocivo del $\text{O}_2^{\cdot-}$ es el de inactivar ciertas enzimas con centros sulfo-férricos debido a su tendencia a ser electrostáticamente atraído por el átomo de hierro de estos centros catalíticos. Tras la unión, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ oxida de forma univalente el centro Fe-S, que en su forma oxidada es inestable y se degrada (Flint *et al.*, 1993). El hierro liberado de estos centros Fe-S dañados puede inducir mutagénesis, por lo que la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ está también relacionada con una alta tasa de mutación (Farr *et al.*, 1986).

El H_2O_2 , aunque es menos reactivo que los radicales $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\cdot\text{OH}$, puede reaccionar con gran cantidad de biomoléculas e inactivar su función, debido a su elevada capacidad de difusión. El H_2O_2 puede oxidar las cadenas laterales de los aminoácidos e inducir la introducción de grupos carbonilo (Stadtman y Levine, 2003), y al igual que el $\text{O}_2^{\cdot-}$, puede oxidar directamente enzimas con grupos Fe-S (Flint *et al.*, 1993). Generalmente, estas modificaciones conllevan una alteración en la estructura de la proteína que conduce a la pérdida de función o actividad; sin embargo, también se han descrito modificaciones reversibles inducidas por H_2O_2 que no suponen pérdida de función como, por ejemplo, la oxidación de metionina a metionina sulfóxido y ciertos estados de oxidación de residuos de cisteína. El H_2O_2 puede oxidar de forma irreversible el grupo tiol (R-SH) de los residuos de cisteína, generándose estados de oxidación como sulfínicos (R-SO₂H) y sulfónicos (R-SO₃H), que producen la inactivación de la proteína. Sin embargo, esta oxidación también puede ser reversible por la formación de grupos sulfénicos (R-SOH) que pueden reducirse de nuevo al grupo tiol (R-SH) o bien reaccionar con otras cisteínas cercanas y formar puentes disulfuro intra o intermoleculares. Esta reversibilidad en la oxidación permite modular actividades enzimáticas o regular la actividad de proteínas que actúan como sensores de ROS (Dubrac y Touati, 2000; Yreus *et al.*, 2003).

En condiciones normales, la concentración intracelular de ROS se encuentra por debajo de los niveles tóxicos, debido a que las células poseen actividades enzimáticas que

se encargan de eliminar estas ROS. Por ejemplo, el $O_2^{\cdot-}$ generado en el interior de la célula es rápidamente eliminado por la enzima superóxido dismutasa. De forma similar, las actividades enzimáticas catalasa, glutatión peroxidasa (GPx), y peroxirredoxina (Prx) son las encargadas de mantener niveles no tóxicos de H_2O_2 y otros peróxidos (Herbig y Helmann, 2001; Mongkolsuk y Helmann, 2002).

1.6.2. Respuestas celulares y sensores de estrés oxidativo

En respuesta a estrés oxidativo, en la célula se activan rutas de transmisión de señales y factores de transcripción específicos que aumentan la expresión de genes que codifican proteínas antioxidantes. Esta respuesta específica a estrés oxidativo tiene como función disminuir los niveles de ROS, así como reparar los daños producidos por estos oxidantes. Para que la célula responda a una situación de estrés oxidativo es necesaria una proteína sensora cuya actividad esté regulada por oxidación/reducción.

En *E. coli* se han identificado y caracterizado dos factores de transcripción que actúan como sensores de estrés oxidativo, OxyR y SoxR, que responden principalmente a H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$, respectivamente. SoxR es un activador transcripcional de la familia MerR (Amabile-Cuevas y Demple, 1991; Wu y Weiss, 1991) que se encuentra unido al DNA en forma de dímero, en el que cada subunidad contiene un grupo 2Fe-2S (Hidalgo *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995). La oxidación o nitrosilación de estos centros 2Fe-2S permite que SoxR pueda activar la transcripción de su único gen diana, *soxS* (Ding *et al.*, 1996; Gaudu y Weiss, 1996). Niveles elevados de SoxS conducen a un incremento en la expresión de genes antioxidantes como *sodA*, que codifica la superóxido dismutasa, o *fpr*, que codifica una NADPH:flavodoxina oxidoreductasa. Los productos génicos del operón *rsx* y del gen *rseC* parecen ser, parcialmente, responsables de mantener los centros 2Fe-2S de SoxR en un estado reducido en ausencia de estrés oxidativo (Koo *et al.*, 2003). SoxR funciona como una proteína de respuesta redox en la cual la interacción entre subunidades es importante para transformar una alteración en el estado de oxidación en cambios profundos en la estructura del DNA (Chander y Demple, 2004).

El factor de transcripción OxyR, en respuesta a altas concentraciones de H_2O_2 u otros agentes oxidantes como el óxido nítrico (NO), activa la transcripción de numerosos genes antioxidantes, como *gorA*, que codifica la glutatión reductasa, o *grxA*, que codifica

una glutarredoxina (Zheng *et al.*, 1998). OxyR se puede encontrar en dos formas en la célula, una forma reducida y una oxidada, aunque sólo esta última tiene actividad transcripcional.

Existen varios genes implicados en los mecanismos de detoxificación de las ROS y de reparación del DNA, como *katB* (catalasa), *sod* (superóxido dismutasa), *ahpCF* (alquil hidropéroxido reductasa) y *dps* (proteínas tipo ferritinas no específicas de unión al ADN) (Quesada-Gómez, 2008). Las alquil hidropéroxido reductasas (AhpCF) son las enzimas responsables del metabolismo de los peróxidos orgánicos mejor caracterizadas en bacterias. AhpCF está formada por una subunidad catalítica AhpC de 22 kDa y una subunidad reductasa AhpF de 52 kDa (Storz *et al.*, 1989; Poole, 1996). El gen *AhpC* se ha conservado evolutivamente, estando presente tanto en bacterias como en humanos. La mutación del gen *AhpC* en bacterias incrementa la sensibilidad a peróxidos orgánicos, llegando a producir la muerte celular y también produce mutagénesis espontánea (Antelmann *et al.*, 1996). Además, estos mutantes defectivos en el gen *AhpC* muestran una alteración adicional inesperada, ya que son hiperresistentes al H₂O₂ (Bsat *et al.*, 1996).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los estudios de asimilación de cianuro en bacterias descritos hasta la fecha son fundamentalmente trabajos realizados con técnicas microbiológicas y bioquímicas tradicionales, pero los análisis a nivel global son casi inexistentes. Un estudio masivo comparativo transcriptómico y proteómico, en respuesta a cianuro, podría ayudar a conocer la complejidad de los mecanismos que utilizan las bacterias cianotrofas para sobrevivir en presencia de este compuesto. El objetivo general de este trabajo ha sido conocer los genes y proteínas involucrados en el metabolismo del cianuro en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Para ello se han abordado los siguientes objetivos concretos:

1. Análisis transcriptómico mediante construcción de micromatrices de DNA de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 en respuesta a cianuro sódico y al residuo cianurado de la joyería.
2. Análisis proteómico de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 en respuesta a limitación de hierro y estudio de mecanismos de resistencia a cianuro.
3. Construcción y caracterización bioquímica de mutantes afectados en homeostasis de hierro y resistencia a cianuro en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Las estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo, así como los plásmidos empleados y sus características más importantes, se presentan en las tablas 8 y 9.

Tabla 8: Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo

Estirpe	Genotipo	Referencia
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT5344		
Silvestre	Estirpe silvestre aislada por su capacidad de utilizar cianuro como fuente de nitrógeno. Nx ^R	Luque-Almagro <i>et al.</i> , 2005a
<i>dctP1</i> ⁻	Mutante de la estirpe CECT5344 deficiente en el gen <i>dctP1</i> . Nx ^R , Gm ^R	Este trabajo
<i>dctP2Q2</i> ⁻	Mutante de la estirpe CECT5344 deficiente en <i>dctP2Q2</i> . Nx ^R , Km ^R	Este trabajo
<i>dctP1</i> ⁻ / <i>dctP2Q2</i> ⁻	Mutante de la estirpe CECT5344 deficiente en los genes <i>dctP1</i> y <i>dctP2Q2</i> . Nx ^R , Gm ^R , Km ^R	Este trabajo
<i>fhuA</i> ⁻	Mutante de la estirpe CECT5344 deficiente en el gen <i>fhuA</i> . Nx ^R , Km ^R	Este trabajo
<i>dapA</i> ⁻	Mutante de la estirpe CECT5344 deficiente en el gen <i>dapA</i> . Nx ^R , Km ^R	Este trabajo
<i>ahpC</i> ⁻	Mutante de la estirpe CECT5344 deficiente en el gen <i>ahpC</i> . Nx ^R	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	Lac ⁻ ; huésped para diversos plásmidos con gen <i>lacZ</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
S17-1	Tra ⁺ ; huésped para plásmidos movilizables <i>mob</i> .	Simon <i>et al.</i> , 1983

Tabla 9: Plásmidos empleados

Plásmido	Características	Referencia
pGEM-T	Vector (Ap ^R) para la clonación de fragmentos de DNA generados mediante PCR	Promega
pBluescript SK(+)	Vector de clonación (Ap ^R)	Stratagene
pMO6-AKm (pBKS::Km)	Plásmido (Km ^R) derivado del pBKS	Pérez Reinado, 2005
pK18 <i>mob</i>	Vector suicida en <i>Pseudomonas</i> derivado de pK18. Km ^R	Schafer <i>et al.</i> , 1994
pMS255	Vector que contiene un casete de resistencia a Gm	Becker <i>et al.</i> , 1995

3.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

3.2.1. Medios de cultivo

3.2.1.1. Medios líquidos

Para el crecimiento de *E. coli* y *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en medio rico se utilizó el medio Luria-Bertani LB (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición se detalla a continuación:

Bactotripton.....	10 g
Extracto de levadura.....	5 g
NaCl.....	5 g
H ₂ O.....	hasta 1 L

Como medio habitual de crecimiento para *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se utilizó el medio mínimo M9 ajustado a un pH 9,5, descrito previamente (Maniatis *et al.*, 1982), que contenía por litro:

Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl.....	0,5 g
Acetato sódico.....	4,1 g
Solución trazas.....	1,25 mL

La fuente de nitrógeno varió en función del experimento. La solución de trazas contenía por litro: MgCl₂ 10,75 g; CaCO₃ 2 g; MgSO₄ · 7 H₂O 6,16 g; FeSO₄ · 7 H₂O 4,75 g; ZnSO₄ · 7 H₂O 1,44 g; MnSO₄ · 7 H₂O 1,12 g; CuSO₄ · 5 H₂O 0,25 g; CoSO₄ · 7 H₂O 0,28 g; H₃BO₃ 0,06 g y 51,3 mL de HCl 12 N.

Los medios se esterilizaron en un autoclave a 126 °C durante 20 min, aunque la solución de trazas del medio M9 se esterilizó por separado, sin el MgSO₄ y con sólo 4,5 g de FeSO₄. El MgSO₄ y el resto del FeSO₄ se prepararon por separado, se esterilizaron por filtración (filtros de 0,22 µm; Millipore), y se añadieron al resto de la solución de trazas.

Cuando el medio de cultivo se utilizó para estirpes bacterianas resistentes a algún antibiótico, estos se añadieron una vez enfriados los medios estériles, a las concentraciones y en los disolventes que se especifican en la tabla 10.

Tabla 10: Antibióticos empleados

Antibiótico	Concentración en la solución de almacenamiento ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Concentración en el medio ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Disolvente
Ampicilina (Ap)	100	100	H ₂ O
Kanamicina (Km)	25	25	H ₂ O
Gentamicina (Gm)	20	20	H ₂ O
Ácido Nalidíxico (Nx)	10	10	NaOH 0,1 M

3.2.1.2. Medios sólidos

Para la preparación de los medios sólidos se añadió bacto-agar a los medios líquidos hasta alcanzar una concentración final del 1,5% (p/v). En este caso, los antibióticos se añadieron después de su esterilización y antes de que el medio solidificara (a una temperatura aproximada de 50 °C).

Cuando la selección de las colonias se realizó utilizando la actividad β -galactosidasa, en la estirpe *E. coli* DH5 α , se empleó medio sólido LB suplementado con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido ($55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido ($40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), añadidos al medio estéril antes de que solidificara.

3.2.2. Condiciones de cultivo

Las diferentes estirpes de *P. pseudoalcaligenes* se cultivaron aeróbicamente a 30 °C y con una agitación constante de 220 rpm, en un incubador orbital MAXQ 4 000 (ThermoScientific). Se emplearon tubos de 15 mL o matraces Erlenmeyer con medio de cultivo con hasta un 10% de su capacidad. Los tubos se cerraron con tapones metálicos y los matraces con algodón hidrófobo estéril.

Para el cultivo de *E. coli* se utilizaron tubos de 15 ml con 3 mL de medio LB, cerrados con tapones metálicos, que se mantuvieron a 37 °C en condiciones de aerobiosis y con una agitación de 220 rpm.

3.3. PUREZA Y MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS

La pureza de los cultivos se siguió rutinariamente extendiendo sobre medio sólido en una placa de Petri una pequeña cantidad del cultivo extraída en condiciones axénicas con un asa de platino. Las estirpes de *E. coli* y de *P. pseudoalcaligenes* se conservaron a -80 °C en medios líquidos LB o M9, respectivamente, con glicerol al 20% (v/v).

3.4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ACELULARES

3.4.1. Recolección de células

Las células de *P. pseudoalcaligenes* se recogieron por centrifugación a 20 000 *g* durante 15 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada Sigma 6K15. Después de retirar el sobrenadante, las células se lavaron dos veces en diferentes tampones, según el ensayo a realizar, y finalmente se resuspendieron en el mismo tampón. Las células de *E. coli* se recogieron mediante centrifugación a 5 000 *g* en una centrífuga miniSpin (Eppendorf) y se resuspendieron en un volumen adecuado del tampón requerido según el experimento.

3.4.2. Preparación de extractos acelulares

Los extractos acelulares de *E. coli* se obtuvieron rompiendo las células por cavitación en un sonicador Vibracell (Sonics & Materials Inc. Danbury). Las células de *P. pseudoalcaligenes* se rompieron tanto por ultrasonidos como por diferencia de presión (prensa de French SLM/Aminco, modelo FA-079). La rotura se llevó a cabo con la prensa en dos pasadas a 16 000 psi, y con el sonicador aplicando 90 W durante tres pulsos de 5 s. En ambos casos las células se mantuvieron en hielo en todo momento para evitar la acción de las proteasas. Los extractos obtenidos se centrifugaron durante 20 min a 15 000 *g* y a 4 °C para eliminar las células enteras y los restos celulares. El sobrenadante obtenido constituyó la fracción soluble (periplasma y citoplasma) utilizado en los ensayos enzimáticos.

3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1. Medida del crecimiento celular

El crecimiento de los cultivos bacterianos se siguió por diferentes métodos:

- a) De forma habitual por turbidimetría, midiendo la absorbancia del cultivo a 600 nm (A_{600}).
- b) Recuento de células viables. La estimación de células viables en los cultivos, expresada como unidades formadoras de colonias por mililitro de cultivo ($CFU \cdot mL^{-1}$), se realizó mediante diluciones seriadas de los cultivos en tampón M9 (pH 9,5). De cada dilución se sembraron alícuotas de 0,1 ml en medio sólido LB.
- c) Concentración de proteína mediante el método de Lowry modificado (Shakir *et al.*, 1994). A 0,3 mL de muestra se le añadió 1 mL de reactivo A, que contenía Na_2CO_3 185 mM; NaOH 98,1 mM; $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ 0,39 mM y $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4 H_2O$, agitándose la mezcla e incubándose a 37 °C durante 3 min. Posteriormente, se añadieron 0,25 mL del reactivo de Folin Ciocalteau, diluido una vez con agua. Después de otros 3 min, a 37 °C, se midió la absorbancia a 750 nm y su valor se interpoló en una recta patrón obtenida con BSA (seroalbúmina bovina).

3.5.2. Determinación de la concentración amonio

Se utilizó el método basado en el reactivo de Nessler (Morrison, 1971). A 0,5 mL de muestra se añadieron 0,5 mL de reactivo de Nessler (preparado mezclando volúmenes iguales de la solución A, que contenía K_2HgI_4 y de la B, que contenía NaOH 1 N diluido 1:3. Después de 5 min, se determinó la absorbancia a 420 nm, interpolándose los resultados en una recta patrón para obtener la concentración de amonio.

3.5.3. Determinación de la concentración cianuro libre

La concentración de cianuro se determinó siguiendo el método de Asmus y Garschagen (1953). A 2,5 mL de muestra, convenientemente diluida, se añadió 0,1 mL de cloramina T al 1 % (p/v) y se incubó durante 1 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 0,3 mL del reactivo B, compuesto por 3 g de ácido barbitúrico, 15 mL de piridina, 3 mL de HCl y agua

hasta 50 mL. A los 8 min, se midió la absorbancia a 578 nm, interpolando el valor obtenido en una recta patrón realizada con NaCN.

3.5.4. Determinación de la concentración α -cetoácidos totales

La producción de α -cetoácidos se determinó colorimétricamente a 520 nm utilizando el método de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (Borchers, 1977). A 250 μ L de muestra se añadieron 50 μ L de NaOH 0,6 N y la mezcla se incubó a 100 °C durante 10 min. Seguidamente, se añadieron 100 μ L de 2,4-dinitrofenilhidrazina al 0,1% preparada en HCl 2 N, manteniéndose esta mezcla a 100 °C durante 4 min. Tras 10 min a temperatura ambiente se añadieron 500 μ L de NaOH 2,5 N, y después de 11 min se midió su absorbancia a 520 nm. Como este método se emplea para la determinación de mezclas de α -cetoácidos, no se puede construir una recta patrón específica y, por lo tanto, los resultados se expresan en cada caso como valores relativos.

3.5.5. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteínas se determinó mediante dos métodos distintos en función de la sensibilidad y rapidez requeridas en cada caso.

- Método de Bradford (1976). Los reactivos para la determinación de proteína fueron suministrados por la casa comercial Biorad (Bio-Rad Dye reagent concentrate). A 0,8 mL de muestra se añadieron 0,2 mL del colorante comercial, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia de la muestra a 595 nm. La concentración de proteína se determinó utilizando como patrón una solución de albúmina bovina (BSA).
- Método de Lowry modificado descrito en el apartado 3.5.1 (Shakir *et al.*, 1994).

3.5.6. Determinación del hierro intracelular

Para la cuantificación del hierro intracelular se partieron de 100 mL de cultivo. Las células se recogieron por centrifugación a 9 000 rpm durante 10 min a 4°C. El precipitado con las células se lavó dos veces con tampón Tris 20 mM (pH 8) y EDTA 4 mM. Se realizó un

primer lavado con 50 mL de tampón y un segundo lavado con 10 mL de tampón. Después del último lavado, las células se resuspendieron en 1 mL de tampón de lavado y se centrifugan a 12 000 rpm durante 10 min.

Las células se incubaron a 80 °C en viales abiertos durante 96 horas, tiempo tras el cual se determinó su peso seco. Posteriormente se añadió 1 mL de ácido nítrico y se incubó a 37° C durante 30 minutos. La mezcla se centrifugó y el precipitado obtenido se lavó con agua destilada antes de determinar su contenido total de hierro, que se llevó a cabo mediante espectroscopía de plasma ICP-MS (plasma de acoplamiento inductivo-espectrómetro de masas) en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba (SCAI).

3.5.7. Actividad catalasa (EC 1.11.1.6)

El ensayo de la actividad catalasa se llevó a cabo midiendo la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, a 25° C, determinado la disminución de absorbancia a 240 nm. La mezcla de reacción contenía tampón fosfato 50 mM (pH 7), H₂O₂ 30 mM y una cantidad conveniente de extracto acelular. La actividad se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar del peróxido de hidrógeno a 240 nm ($\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un μmol de producto, o la desaparición de un μmol de sustrato, por minuto.

3.6. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DEL DNA

3.6.1. Aislamiento del DNA

3.6.1.1. Aislamiento del DNA total

Para el aislamiento del DNA total de las diferentes estirpes bacterianas empleadas en este trabajo se utilizó el kit comercial para extracción de DNA genómico Wizard Genomic DNA Purification (Promega). El protocolo de extracción y los tampones utilizados fueron los recomendados por la casa comercial.

3.6.1.2. Extracción del DNA plasmídico

El DNA plasmídico se aisló utilizando el kit "FavorPrep, plasmid extraction mini kit" (Favorgen). El protocolo de extracción y los tampones utilizados fueron los recomendados por la casa comercial. El método consiste en una lisis alcalina de las células seguida de una cromatografía de intercambio aniónico, en la cual el DNA es retenido y lavado selectivamente, lo que permite la eliminación de la mayor parte del RNA, proteínas y otros contaminantes celulares.

3.6.1.3. Cuantificación del DNA

La cantidad de DNA se determinó visualizándolo en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio en los que se incluían además patrones de proteínas de concentración conocida. Dado que el nivel de fluorescencia de los ácidos nucleicos en presencia de bromuro de etidio es directamente proporcional a la cantidad de DNA presente, la concentración de las muestras se pudo estimar por comparación de sus fluorescencias relativas respecto de las que presentaban los patrones.

Cuando se requirió una cuantificación más exacta, se utilizó un nanodrop (Nanodrop 1 000, Agilent Technologies) para la cuantificación espectrofotométrica del DNA. Para ello, se utilizaron 2 μ L de muestra y se determinó su absorbancia a 260 y a 280 nm frente a un blanco de H₂O. Para el cálculo de la concentración de DNA se consideró un valor estándar de $A_{260} = 1$ para soluciones con 50 μ g·mL⁻¹ de DNA de cadena doble. La pureza del DNA se estimó por la relación A_{260}/A_{280} nm, considerándose de buena calidad cuando esta relación era próxima a 1,8.

3.6.1.4. Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR)

Las reacciones de amplificación del DNA de doble cadena se realizaron en un termociclador (C1000TM, Biorad). Para la amplificación de los fragmentos se utilizó el sistema BIOTAQTM DNA Polymerase (Bioline). Cada reacción de PCR contenía, además del DNA a amplificar y la polimerasa, los cebadores correspondientes, una mezcla de desoxirribonucleótidos y el

tampón especificado por la casa comercial. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de amplificación de DNA se muestran en la tabla 11.

Tabla 11: Cebadores utilizados en reacciones de PCR

Nombre	Secuencia (5' → 3')*
dctP1F	ATGGCCTGACCTTCTCCGGCGCTGG
dctP1R	TCACCGGTTGCTGCATGTTTCGATG
dctP2F	TCTAGAGAGGTGATCGAACAGCAGCGGCATG
dctQ2R	TCTAGACGCCGTTGTAGGTGTTGGTGCCGAG
dctP2ExtF	CAGCGGTATGCGGGTGACCACGAAG
dctQ2ExtR	AACAGCGGAATGGCGATCAGCGGGTA
fhuAExtF	CGGCAAGTTCAGCGGCCTGATCGAA
fhuAExtR	TGCCCGGCACGCTGAATACCGCATT
orf3F	GTT CGT GCG TCA GGC GCT GGG GGT A
orf3R	TGA CGC CCA GCA GTG TCA CGC CCA C
dapAF	CGGGATCCG TCCGCTGGCATGTGCAGTAGGCGAGA
dapAR	CCAAGCTT GCCATGGCACCGAAGATCCATCCCAGG
ahpCF	CGCTTTCCACAACGGCAAGTT
ahpCR	TTAACGCTGCAAATCCATGTTTCG
3251-C	CGGCAGGATCACCAGGTCAGC
3251-D	AAACCCGATCTCGAACTGGCG
nitC1	TGAGCGTATGGTCTGGGGGACGGG
nitC2	CGCCGCATGAATCTGCTCGCCATC
258-A	TGGCGGTGCGGTAGAAGAGGATT
258-B	ATCGGTGTCGGCATCTGCTGGG
1912-A	GGAAGGGCGGTGTTTCGTGATA
1912-B	GTCAAAGGTAGGGGCGACCAAG
cioA-1	GGCTTTCTCGGCGTGATGC
cioA-2	TCGTGTCCCTGCGGCGTCT
cioB-1	CGCACGCTCAATGACGACCC
cioB-2	CGATGGAGGCACGATGTTGG
873-A	CCGCCACGTTTTTCACCGACCA
873-B	CCGCTGTGCTGTTCCCTGCCCAA
2541-A	CATCGCCTGGTTGTCCGCCTC
2541-B	CGGCAAACCTGGTGGACGACGC
2819-A	TCCCCCTTCAATGCCTCACCG
2819-B	CCTGCGTCTGCGTGCCAAGCG
2215-A	CCCCAACAACTCGACACAACCG
2215-B	GAGAAGCAAGGCGTGACAACCG

*En negrita y subrayados se indican sitios de restricción

Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min, tuvieron lugar 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 45 s de hibridación entre los cebadores y el DNA molde a la temperatura (T_m) adecuada para cada pareja de cebadores y 1 min de extensión por cada kb de DNA molde; a estos 30 ciclos le siguieron 7 min a 72 °C, para finalizar una posible extensión incompleta de los productos de PCR. Ocasionalmente, los productos obtenidos tras la amplificación se

purificaron utilizando el sistema comercial "Favorprep, GEL/PCR purification mini kit" (Favorgen) para eliminar los cebadores y los dNTPs; también se recurrió a separar el DNA mediante electroforesis y recuperar el fragmento de interés como se describe en los apartados 3.6.1.6 y 3.6.1.7 de esta sección.

3.6.1.5. Digestión del DNA con enzimas de restricción

Las reacciones de digestión del DNA con endonucleasas de restricción contenían 0,5 µg de DNA, 0,1 volúmenes de tampón de restricción (10X) y 0,5 U de la enzima de restricción en un volumen final de 10 µL completados con H₂O. Las condiciones utilizadas fueron las recomendadas por la casa comercial (New England Biolabs) con respecto a los tampones requeridos, así como a las temperaturas y a los tiempos óptimos para una mayor eficiencia de las diferentes enzimas. En las digestiones del DNA con dos o más enzimas de restricción se empleó el tampón específico en el que más eficientemente actuaron las enzimas utilizadas.

3.6.1.6. Electroforesis del DNA

La separación de fragmentos de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis utilizando geles de agarosa al 0,8% (p/v) preparados en tampón TAE (Sambrook *et al.*, 1989) que contenía Tris-acético 40 mM (pH 8) y EDTA 0,5 M. A cada 5 µL de muestra de DNA se añadió 1 µL de tampón de carga que contenía glicerol al 30% (v/v), azul de bromofenol al 0,3% (p/v) y azul de xilencianol al 0,3% (p/v). La mezcla se depositó en un pocillo del gel, sumergido en una cubeta con tampón TAE. La separación se realizó por electroforesis horizontal a 80 V durante el tiempo necesario para obtener una separación adecuada de los distintos fragmentos presentes en la muestra. Para visualizar el DNA en los geles, estos se tiñeron en una solución de bromuro de etidio ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 15 min y después se expusieron a radiación ultravioleta (220 nm) en un transiluminador, digitalizando posteriormente la imagen en un sistema Kodak EDAS 290. El tamaño de los fragmentos de DNA se estimó por interpolación en curvas logarítmicas del tamaño de cada fragmento frente a su movilidad relativa, utilizando como patrón los fragmentos de DNA del marcador "Quick-load[®] purple 2-Log DNA ladder" (New England Biolabs).

3.6.1.7. Recuperación de fragmentos de DNA de los geles de agarosa

Para la recuperación de fragmentos de DNA de los geles de agarosa se utilizó el sistema comercial de Favorgen (Favorprep, GEL/PCR purification mini kit) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6.1.8. Ligación del DNA

Para la ligación de moléculas de DNA se partió de fragmentos lineales obtenidos por digestión con enzimas de restricción en sitios compatibles para la ligación o de fragmentos lineales obtenidos por PCR. La reacción se llevó a cabo añadiendo 3 U de DNA-ligasa del fago T4 (New England Biolabs), el tampón de ligación suministrado por la casa comercial y las concentraciones adecuadas de los DNA en un volumen final de 10-15 μL completado con H_2O . La mezcla de reacción se incubó a 15 $^{\circ}\text{C}$ durante 12 h. Transcurrido este tiempo, se utilizó esta mezcla para transformar células competentes de *E. coli*.

3.6.2. Transformación de células de *E. coli*

La introducción de plásmidos en la estirpe DH5 α de *E. coli* se llevó a cabo según el método descrito por Mandel y Higa (1970), basado en la capacidad que adquieren las células de esta estirpe de captar DNA exógeno cuando se tratan en frío con una disolución de cloruro cálcico.

3.6.2.1. Preparación de células competentes

La estirpe DH5 α se cultivó en LB durante 12 h hasta alcanzar una fase estacionaria. El cultivo se diluyó 50 veces con el mismo medio y se incubó 2 horas hasta alcanzar una A_{600} de 0,5 (equivalente a 5×10^7 células $\cdot\text{mL}^{-1}$). Las células se centrifugaron a 5 000 g durante 5 min a 4 $^{\circ}\text{C}$ y el precipitado con las células se resuspendió en la mitad del volumen de partida con una solución fría de CaCl_2 50 mM. La suspensión celular se incubó en hielo durante 30 min, tiempo tras el que volvió a centrifugarse en las condiciones ya descritas. Las células se resuspendieron en una décima parte del volumen inicial con la solución fría de CaCl_2 50 mM, obteniéndose finalmente las células competentes.

3.6.2.2. Transformación de las células competentes

La mezcla de transformación contenía: 10 μ L de la preparación de DNA plasmídico, 200 μ L de la suspensión de células competentes y 100 μ L de un tampón TCM que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 7,5); CaCl_2 10 mM y MgCl_2 10 mM. La muestra se incubó 30 min en hielo y posteriormente a 42 °C durante 90 s. Después del choque térmico se añadieron 700 μ L de medio LB, se incubó 45 min a 37 °C y se extendió la suspensión en medio sólido selectivo con los antibióticos correspondientes.

3.6.2.3. Transferencia de plásmidos por conjugación

La movilización de plásmidos a *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se realizó mediante conjugación biparental según Herrero *et al.* (1990). En esta transferencia de DNA participaron las cepas donadora (*E. coli* S17-1) y receptora (*P. pseudoalcaligenes* CECT5344). Los transconjugantes se seleccionaron en medio mínimo que contenía los nutrientes y los antibióticos adecuados para la selección del receptor del plásmido movilizable. Para obtener colonias aisladas se sembraron diluciones seriadas de la mezcla de conjugación en el medio de selección.

3.6.3. Mutagénesis dirigida

En este trabajo se llevó a cabo la mutagénesis de algunos genes de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 mediante la inserción de cassettes de resistencia a antibióticos por recombinación homóloga. En algunos casos esta inserción también supuso una delección. Según el caso, la selección de los transconjugantes fue de aquellos que sufrieron dos eventos de recombinación, incorporando sólo el cassette de resistencia a antibiótico, o de aquellos que incorporaron todo el vector suicida, incluyendo el cassette de resistencia presente en este, mediante un sólo evento de recombinación. Todos los mutantes se comprobaron mediante PCR.

3.6.3.1. Mutante *dctP1*⁻ (BN5_4141)

Mediante PCR, y utilizando los oligonucleótidos *dctP1F* y *dctP1R* (Tabla 11), se amplificó un fragmento de 1 500 pb que contenía el gen *dctP1* (BN5_4141), que codifica el componente periplásmico de un transportador de ácidos dicarboxílicos en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. El producto resultante se clonó en el vector de clonación pGEM-T Easy. Utilizando el sitio *PstI* presente en la parte central del fragmento clonado, se insertó un cassette de resistencia a gentamicina procedente del vector pMS255. El gen *dctP1* interrumpido con el cassette de resistencia a gentamicina se extrajo de pGEM-T Easy como un fragmento *SpeI* y *SphI* y este fue clonado en el vector suicida pK18*mob* previamente linealizado con *XbaI* y *SphI*. Esta construcción fue transferida de la estirpe DH5 α a la estirpe S17-1 de *E. coli*, que fue utilizada, junto a la estirpe silvestre de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, en la conjugación biparental. Los transconjugantes se seleccionaron por su resistencia al ácido nalidíxico y gentamicina y su sensibilidad a kanamicina, obteniéndose así mutantes que insertaron el cassette de resistencia a gentamicina en el gen *dctP1* mediante dos eventos de recombinación.

3.6.3.2. Mutante *dctP2Q2*⁻ (BN5_1318)

Con los oligonucleótidos *dctP2F/dctQ2R* se amplificó mediante PCR un fragmento que comprendía parte de los genes *dctQ2* y *dctP2*, que codifican la proteína de membrana DctQ2 y el componente periplásmico de un transportador de ácidos dicarboxílicos DctP2. El producto amplificado se clonó en el vector pGEM-T Easy, de donde se extrajo con *XbaI* para su posterior clonación en el vector resistente a kanamicina pK18*mob*. En este vector suicida el fragmento *dctP2Q2* fue interrumpido por inserción del cassette de resistencia a kanamicina en los sitios *BamHI* y *XhoI*. La construcción resultante se transfirió a la estirpe S17-1 de *E. coli*, con la que se llevó a cabo la conjugación junto con la estirpe silvestre de *P. psseudoalcaligenes* CECT5344. Los transconjugantes se seleccionaron por su resistencia a kanamicina, obteniéndose así tanto recombinantes simples como dobles. Para comprobar la mutación se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos *dctP2F* y *dctQ2R* (Tabla 11) y el tamaño del fragmento de PCR obtenido de 1 510 pb confirmó la presencia de la mutación.

3.6.3.3. Mutante *dctP1*⁻/*dctP2Q2*⁻

Para la construcción del doble mutante *dctP1*⁻/*dctP2Q2*⁻ se realizó una conjugación con la estirpe mutante *dctP2Q2*⁻ de *P. pseudoalcaligenes* (estirpe receptora) y la estirpe *E. coli* S17-1 conteniendo el gen *dctP1* interrumpido por el cassette de resistencia a gentamicina en el plásmido pK18*mob* (estirpe donadora). La selección de transconjugantes con la doble mutación se realizó en medio LB con kanamicina y gentamicina.

3.6.3.4. Mutante *dapA*⁻ (BN5_1907)

Para la construcción del mutante *dapA*⁻ se amplificó el gen BN5_1907 mediante PCR con los oligonucleótidos *dapAF* y *dapAR* (Tabla 11), obteniéndose un fragmento de 1 812 pb que fue clonado en pGEM-T. Utilizando dos sitios *EcoRI* en la parte central del fragmento clonado, la construcción se linealizó mediante digestión con *EcoRI*, clonando posteriormente en este sitio un cassette de resistencia a gentamicina previamente extraído como un fragmento *EcoRI* del vector pMS255. El fragmento correspondiente al gen *dapA* interrumpido por el cassette de resistencia a gentamicina se extrajo de pGEM-T usando los sitios de restricción *BamHI* y *HindIII* introducidos en los oligonucleótidos utilizados inicialmente. Este fragmento se clonó en el vector suicida pK18*mob* y la construcción resultante fue transferida finalmente a la estirpe S17-1 de *E. coli*, con la que se llevó a cabo la conjugación junto a la estirpe silvestre.

3.6.3.5. Mutante *fhuA*⁻ (BN5_0694)

Mediante PCR se amplificó un fragmento de 3 257 pb, que contenía el gen *fhuA*, usando como cebadores los oligonucleótidos *fhuAExtF* y *fhuAExtR* (Tabla 11) y DNA genómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 como molde. El producto resultante se clonó en el vector pGEM-T Easy, digiriendo posteriormente la construcción obtenida con las enzimas *BbrPI* y *EcoRV*, cuyos sitios estaban presentes en el gen *fhuA*. Así se realizó una delección de 640 pb del gen *fhuA* y dichos cortes fueron utilizados para insertar un cassette de resistencia kanamicina obtenido previamente del plásmido pMO6-AKm (resistente a Km y derivado del plásmido pBKS) como un fragmento *EcoRV/HincII*. Utilizando el sitio *EcoRI* de pGEM-T

Easy y un sitio *EcoRI* adyacente al gen *fhuA*, se obtuvo un fragmento de 3 189 pb conteniendo el gen *fhuA* deletado e interrumpido por el gen de resistencia a kanamicina. Este fragmento *EcoRI* se clonó en el vector suicida pK18mob, obteniéndose así la construcción con la que se realizó la conjugación biparental entre la estirpe donadora *E. coli* S17-1 y la estirpe silvestre receptora CECT5344 de *P. pseudoalcaligenes*. Los transconjugantes se seleccionaron en medio rico LB con kanamicina y ácido nalidíxico. Para comprobar la mutación se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos *fhuAExtF* y *fhuAExtR* (Tabla 11) y DNA genómico de las colonias transconjugantes como DNA molde. El tamaño del fragmento de PCR obtenido fue de 3 189 pb, lo que confirmó la mutación en el gen *fhuA*.

3.6.3.6. Mutante *orf3*⁻ (BN5_0248)

Mediante PCR se amplificó un fragmento de 1 476 pb que comprendía el gen *orf3* usando como cebadores los oligonucleótidos *orf3F* y *orf3R* (Tabla 11) y DNA genómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 como molde. El producto resultante se clonó en el vector pGEM-T Easy, obteniéndose el plásmido pGEMT-*orf3*. El gen *orf3* fue mutado por inserción del cassette de kanamicina en el sitio de restricción *SfoI*. Este plásmido se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* y se obtuvo un fragmento de 2.965 pb que contenía al gen *orf3*. Dicho fragmento se clonó en el vector pK18mob δ E, que presenta un marcador de resistencia a kanamicina, obteniéndose el plásmido pK18mob δ E-*orf3*, el cual se transfirió mediante conjugación desde la estirpe donadora *E. coli* S17-1 a la estirpe receptora CECT5344 de *P. pseudoalcaligenes*, que es resistente al ácido nalidíxico, obteniéndose mediante recombinación homóloga el mutante deficiente en el gen *orf3*. Los transconjugantes se sembraron en medio rico LB con kanamicina y ácido nalidíxico. Para comprobar la incorporación de la mutación se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos *orf3F* y *orf3R* (Tabla 11) y DNA genómico de las colonias transconjugantes como DNA molde, pero no se consiguió encontrar ninguna colonia correspondiente a un recombinante doble.

3.6.3.7. Mutante *ahpC*⁻ (BN5_3036)

El mutante de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 afectado en el gen *ahpC* se llevó a cabo amplificando por PCR con los oligonucleótidos *ahpCF* y *ahpCR* (Tabla 11) un fragmento conteniendo dicho gen. El fragmento obtenido se clonó en el vector pGEM-Teasy, siendo posteriormente subclonado como *EcoRI/XmaI* en el vector suicida pK18*mob*. Esta construcción se transfirió de *E. coli* DH5 α a la estirpe S17-1, con la que se llevó a cabo la conjugación junto con la estirpe silvestre *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. La mezcla de conjugación se sembró en medios con ácido nalidíxico y kanamicina, por lo que los transconjugantes seleccionados fueron aquellos que mediante un único evento de recombinación insertaron en el gen *ahpC* toda la construcción, incluyendo el gen de resistencia a kanamicina.

3.6.4. Secuenciación del DNA

La secuenciación del DNA plasmídico y de los fragmentos de DNA amplificados por PCR se realizó mediante el uso de la química BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) y utilizando los secuenciadores ABIPrism 310 Genetic Analyzer (1 capilar) y ABIPrism 3130XL Genetic Analyzer (multicapilar) de Applied Biosystems del servicio de genómica del SCAI (UCO).

3.6.5. Tratamiento y análisis de secuencias

Para el tratamiento y análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos, incluyendo la determinación de las fases abiertas de lectura, los sitios de restricción, uso de codones, perfiles de hidropatía, composición de aminoácidos, etc., se empleó el paquete informático Lasergene 8 (DNASTAR). La comparación de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos con las distintas bases de datos se realizó con el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997), disponible en el servidor de Internet del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). El alineamiento de secuencias peptídicas se realizó con el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994).

3.7. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 MEDIANTE MICROMATRICES DE DNA

3.7.1. Diseño de los microarrays

Utilizando el software eArray (Agilent Technologies) se diseñaron oligonucleótidos de 60 pb para las 4 434 fases de lectura abierta presentes en el genoma *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Wibberg *et al.*, 2014), siendo el total de sondas de 30 000, aproximadamente siete sondas por gen. Se utilizó un microarray de expresión génica personalizado 8x60K (ID 061413, Agilent Technologies). El diseño experimental consistió en la comparación de cuatro condiciones (C1, cloruro amónico; C2, cianuro sódico; C3, residuo joyero y C4, control sin nitrógeno) con cuatro réplicas biológicas cada una, en un diseño tipo loop.

3.7.2. Cultivo de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

Para el análisis transcriptómico la estirpe CECT5344 se cultivó en medio mínimo M9 (pH 9,5) con acetato sódico 50 mM como fuente de carbono y cloruro amónico 2 mM como fuente de nitrógeno. Después de 24 horas, cuando el amonio se había consumido, se añadió a los cultivos como fuente de nitrógeno adicional y a una concentración 2 mM, cianuro sódico, residuo de la joyería o cloruro amónico. A un cuarto cultivo usado como control no se le añadió fuente de nitrógeno. A partir de este momento los cultivos (cuatro réplicas biológicas por condición) se volvieron a incubar a 30 °C y 220 rpm de agitación, y cuando los cultivos consumieron entre el 50-70% de la fuente de nitrógeno, estos se recogieron por centrifugación a 4 000 g durante 5 minutos a 4°C. En el caso de los cultivos a los que no se añadió fuente de nitrógeno adicional estos se recogieron en el mismo momento que se recogieron los cultivos con cianuro o residuo. Las células se conservaron a -80 °C hasta su posterior utilización.

3.7.3. Aislamiento del ARN total

Las células de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se resuspendieron en 500 µL de un buffer que contenía lisozima y se rompieron inmediatamente usando el RNeasy Midi Kit (Qiagen),

siguiendo las instrucciones del fabricante. La eliminación del DNA presente en las muestras obtenidas se llevó a cabo en columna con RNase-free DNase set (Qiagen) y posteriormente (postcolumna) se aplicó un tratamiento adicional con DNase I (Ambion). La calidad y cantidad de RNA fue comprobada en un Bioanalyzer (Agilent) y por espectrofotometría (Nanodrop 1000, Agilent Technologies-Wilmington, DE, USA). Todas las muestras presentaron un número de integridad (RIN) superior a 7.

3.7.4. Retrotranscripción, marcaje del cDNA e hibridación

El RNA total de cada muestra fue retrotranscrito y el cDNA obtenido marcado e hibridado con el microarray siguiendo el protocolo Two-Color Microarray-Based Prokaryote Analysis v 1.4, FairPlay III Labelling, de Agilent Technologies. La síntesis de cDNA se llevó a cabo con la retrotranscriptasa Affinity ScriptTM HC (Agilent Technologies). Posteriormente, el cDNA obtenido se marcó con un método de acoplamiento químico usando los fluoróforos Cy3 y Cy5. Después de la hibridación, los chips de microarrays se lavaron e inmediatamente se escanearon con un escáner de DNA Microarray (Modelo G2505C, Agilent Technologies).

3.7.5. Análisis de los microarrays

El análisis de la expresión génica se realizó con el Feature Extraction Software (v. 10.7) de Agilent y utilizando las variables por defecto. Las características de salida de los arrays se configuraron con el mismo software. El análisis de los datos se realizó con el paquete Bioconductor, bajo el entorno R. El procesamiento de los datos y el análisis de expresión diferencial se realizaron con el paquete Limma (<http://www.bioconductor.org/>), usando las últimas anotaciones disponibles de los genes. Los valores de intensidad se corrigieron con el algoritmo de corrección de fondo Normexp. La normalización intra-array se realizó según el método Loess y la normalización inter-array con el método Aquantile. La expresión génica se consideró sobreexpresada o reprimida cuando cambió un número de veces $\geq 2,1$ o $\leq 2,1$, respectivamente. Estos cambios se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor p fue inferior a 0,01. Los datos de los microarrays están depositados en la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) con el número de acceso GSE69930.

El análisis funcional se realizó con *GOStats* (Bioconductor), que identifica términos *GO* (Gene Ontology) significativamente enriquecidos a partir de una lista de genes calculando la probabilidad hipergeométrica de que un término *GO* determinado esté representado más veces de las que se esperaría al azar. Sólo se consideraron los resultados *GOStats* con un valor $p < 0,01$.

3.7.6. Validación de los microarrays

La validación de los resultados obtenidos en los microarrays se llevó a cabo por RT-qPCR. Para ello se aisló el RNA de cultivos de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 que habían sido sometidos a las mismas condiciones expuestas en el apartado 3.7.2. La concentración y pureza del RNA aislado se analizó en un espectrofotómetro ND1000 (Nanodrop 1000, Agilent Technologies-Wilmington, DE, USA). La síntesis de DNAc total se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L, conteniendo 500 ng de RNA; 0,7 mM dNTPs; 200 U de la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen) y 3,75 mM de hexámeros aleatorios (Applied Biosystems). Las muestras se incubaron inicialmente a 65 °C durante 5 minutos y finalmente a 42 °C durante 50 minutos; finalmente se incubaron a 70° C durante 15 minutos. Para la PCR cuantitativa el DNAc se purificó con "Favorprep Gel/PCR purification kit" (Favorgen), midiéndose posteriormente la concentración de DNAc en un espectrofotómetro ND1000. Se utilizó el "iQ5 Multicolour Real-Time PCR Detection System" (Bio-Rad) en una reacción de 25 μ L (volumen final) que contenía: 2 μ L de DNAc diluido (12,5; 2,5 y 0,5 ng), 12,5 μ L de "iQ SYBR Green Supermix" (Bio-Rad) y 0,2 mM de cada oligonucleótido específico para el gen a validar: 3251-C y 3251-D (para el gen *nit3*; BN5_3251), nitC1 y nitC2 (para el gen *nitC*; BN5_1632), 258-A y 259-B (para el gen *aguB*; BN5_0258), 1912-A y 1912-B (para el gen *nit4*; BN5_1912), cioA-1 y cioA-2 (para el gen *cioA*; BN5_1902) y cioB-1 y cioB-2 (para el gen *cioB*; BN5_1903) (Tabla 11). Los cDNAs diana y las muestras de referencia se amplificaron tres veces en reacciones de PCR separadas. Las muestras se desnaturalizaron inicialmente calentando a 95 °C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de amplificación (95 °C, 30 s; unión de los cebadores a 60 °C, 30 s; elongación y adquisición de la señal, 72 °C, 30 s). Para la cuantificación relativa de los valores de fluorescencia se utilizó una curva de calibrado usando diluciones seriadas de 50

a 0,0005 ng de DNA genómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. La normalización de los datos se realizó usando los genes de referencia que codifican la metiltransferasa del rRNA 16S (BN5_0873, oligonucleótidos 873-A y 873-B), la metiltransferasa del rRNA 23S (BN5_2541, oligonucleótidos 2541-A y 2541-B), y las subunidades α y ε de la DNA polimerasa III (BN5_2819, oligonucleótidos 2819-A y 2819-B; BN5_2215, oligos 2215-A y 2215-B, respectivamente). La validación se llevó a cabo en tres experimentos independientes.

3.8. ANÁLISIS PROTEÓMICO 2D-PAGE

3.8.1. Fraccionamiento subcelular

Para la realización de geles 2D-PAGE se partió de 600 mL de cultivo en fase exponencial, que se recogió por centrifugación a 15 000 *g* durante 10 min a 4 °C. Después de retirar el sobrenadante, las células se lavaron dos veces en un tampón fosfato pH 7 con baja concentración de sal que contenía KCl 3 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; NaH₂PO₄ 9 mM y NaCl 68 mM. Las células se congelaron a -80 °C hasta su uso, momento en el que las células se resuspendieron en tampón Tris-HCl 40 mM (pH 9) que contenía DNasa 65 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y RNasa 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las células se rompieron por cavitación en un sonicador (Vibracell/Sonics & Materials Inc. Danbury) aplicando 90 W durante tres pulsos de 5 s. A los extractos obtenidos se les añadió una mezcla de inhibidores de proteasas que contenía PMSF 7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; leupeptina 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y peptatina A 2,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A continuación se centrifugaron durante 30 min a 20 000 *g* y 4 °C para eliminar las células enteras y los restos celulares. El sobrenadante resultante se utilizó como fracción soluble (periplasma y citoplasma).

3.8.2. Preparación de la muestra

Una vez obtenida la fracción soluble, se procedió a la eliminación de lípidos y sales mediante un protocolo de precipitación de proteínas que se detalla a continuación. A 200 μL de muestra se le añadieron 800 μL de metanol, mezclando posteriormente con vórtex. A continuación, se añadieron 200 μL de cloroformo y se mezcló nuevamente con vórtex. Después, se añadió a la mezcla 600 μL de agua destilada. Una vez mezclada, la muestra presentó un aspecto lechoso debido a la precipitación de las proteínas. La mezcla se

centrifugó a 10 000 *g* durante 5 min, concentrándose las proteínas en la interfase y formando un anillo blanco. La fase superior fue eliminada, sin arrastrar el precipitado blanco, y se añadieron 600 μ L de metanol. La mezcla se agitó con vórtex, centrifugándose posteriormente a 10 000 *g* durante 5 min. El sobrenadante se eliminó y el precipitado blanco se dejó secar sobre papel en el vial durante 15 min. Finalmente, las proteínas se resuspendieron suavemente en 400 μ L de tampón de solubilización que contenía urea 7 M; tiourea 2 M; CHAPS 4% (p/v); DTT 50 mM e IPG-buffer 3-10 al 2% (v/v). La concentración de proteína en la muestra final se determinó mediante el método de Bradford.

3.8.3. Isoelectroenfoque (IEF)

Para la primera dimensión se utilizó un volumen de muestra que contenía 250 μ g de proteína total, el cual se completó con tampón de solubilización hasta 200 μ L (en este caso el tampón de solubilización incluyó trazas de azul de bromofenol). La primera dimensión se llevó a cabo usando el sistema IPGphor de Pharmacia. Las tiras de IEF utilizadas fueron de 11 cm (GE Healthcare) de diferentes intervalos de pH.

Las muestras, previamente centrifugadas a 12 000 *g* durante 5 min para eliminar cualquier material insoluble, se aplicaron en los sarcófagos, y sobre cada muestra se colocó una tira de IEF con el gel hacia abajo. Posteriormente, los geles se cubrieron con aceite mineral. Para una completa absorción de las proteínas y rehidratación de los geles se llevó a cabo una rehidratación pasiva, sin aplicar voltaje, durante 12 h. Posteriormente, se aplicó un programa de IEF como se presenta en la tabla 12.

Tabla 12: Programa de IEF

Paso	Voltaje (V)	Tiempo (h)
Rehidratación	0	12:00
1	500	1:00
2	1 000	1:00
3	8 000	hasta 18 000 V hr ⁻¹

Tanto la rehidratación como el IEF se llevaron a cabo a 20 °C. Durante el IEF se aplicó una corriente de 50 μ A por gel.

3.8.4. Equilibrado de las tiras de IEF

Previamente a la segunda dimensión, las tiras de IEF se equilibraron en dos pasos (15 min/paso) en tampón de equilibrado que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,8); urea 6 M; glicerol al 30% (v/v); SDS al 2% (p/v) y trazas de azul de bromofenol. El primer paso se llevó a cabo en tampón de equilibrado conteniendo DTT 10 mg·mL⁻¹, y a continuación el segundo paso se sustituyó el DTT por yodoacetamida 25 mg·mL⁻¹.

3.8.5. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La segunda dimensión de la electroforesis bidimensional se llevó a cabo usando el sistema Hoefer SE 600 (Pharmacia). Todo el material se lavó cuidadosamente con agua destilada y etanol. Las tiras de IEF equilibradas se colocaron sobre los geles de poliacrilamida, preparados al 12,5%, y posteriormente se sellaron con agarosa al 0,5% (p/v). La electroforesis se llevó a cabo a 15 mA/gel durante los primeros 15 minutos, tiempo tras el cual se incrementó la intensidad a 30 mA/gel, hasta que el frente alcanzó el final del gel. En ambos casos la temperatura se mantuvo a 20 °C.

3.8.6. Tinción de los geles

La visualización de proteínas en los geles bidimensionales se realizó utilizando la tinción Coomassie o la tinción Sypro, en ambos casos tinciones compatibles con la espectrometría de masas:

- Tinción de Coomassie: Los geles se lavaron con agua destilada y después se incubaron en agitación suave durante 12 h con el colorante Coomassie Brilliant blue G250 2g·L⁻¹ y R250 0,5 g·L⁻¹, metanol al 5% (v/v), etanol al 42,5% (v/v) y ácido acético al 10%. A continuación, se retiró el colorante y se procedió a la destinción de los geles en dos pasos. En un primer paso los geles teñidos se lavaron (2 x 15 min) con una solución de desteñido rápida que contenía etanol al 30% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v). Posteriormente, se incubaron durante 12 h con una solución de desteñido lenta que contenía ácido acético al 7% (v/v). Por último, los geles se lavaron con agua destilada y se mantuvieron a 4 °C sin pérdida significativa de tinción.

- Tinción con SYPRO® (Biorad): Los geles se retiraron de los cristales y se colocaron en una bandeja, donde se incubaron en agitación durante una hora en una solución de fijación que contenía metanol al 10% (v/v) y acético al 7% (v/v). A continuación, se retiró la solución de fijación y se cubrió cada gel con la tinción Sypro, incubándose toda la noche en agitación lenta y protegida de la luz. Al día siguiente se retiró la tinción y se lavaron los geles durante una hora con la solución de fijación para disminuir el ruido de fondo. Finalmente, los geles se lavaron con agua destilada antes de ser escaneados.

3.8.7. Adquisición de imágenes y análisis de los geles

Los geles se escanearon con un escáner de fluorescencia FX Pro Plus Multiimager (Biorad). Posteriormente, las imágenes se analizaron mediante el software ImageMaster 2D v3.1 (Pharmacia). En dicho análisis se identificaron aquellas manchas (proteínas resueltas en la electroforesis bidimensional) cuyos cambios, tanto cualitativos como cuantitativos, se consideraron más significativos.

3.8.8. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

Las proteínas de interés se identificaron en el SCAI (UCO) mediante el picado de las manchas con una estación automática ProPic (Genomics Solutions), su digestión con tripsina porcina y el análisis de los péptidos resultantes por espectrometría de masas en un MALDI-TOF/TOF (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems). Para ello, se depositó la digestión de proteínas sobre una placa MALDI junto con una matriz (α -ciano-4-hidroxicinámico) usando una estación automática de dispensación de proteínas sobre Placa de MALDI (Pro MS MALDI, Genomic Solutions). Mediante MALDI-TOF/TOF se obtuvo un espectro de masas (MS) denominado huella peptídica, y adicionalmente se obtuvieron los espectros de fragmentación (MS/MS) de las 3-5 masas mayoritarias dentro de cada una de las huellas peptídicas. La identificación de proteínas se realizó automáticamente mediante el sistema GPS (Global Protein Server) acoplado a los datos del TOF-TOF, combinando ambos tipos de espectros (MS-MS/MS) obtenidos para cada muestra y usando como motor

de búsqueda MASCOT (Matrix Science, UK) sobre bases de datos públicas de secuencias de proteínas.

3.9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todos los experimentos presentados en este trabajo se realizaron por triplicado o por cuatruplicado. En las curvas de crecimiento y los geles 2D-PAGE únicamente se muestra uno de los experimentos más representativos. Los valores de actividad enzimática mostrados son la media de tres experimentos diferentes, siendo en todos los casos la desviación estándar inferior al 10%. La expresión génica se consideró sobreexpresada o reprimida cuando cambió un número de veces $\geq 2,1$ o $\leq 2,1$, respectivamente. Estos cambios se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor p fue inferior a 0,01.

3.10. REACTIVOS Y APARATOS

El residuo de la industria joyera fue amablemente cedido por la empresa GEMASUR. La concentración de cianuro total de este residuo fue de 1,5 M, siendo la concentración de cianuro libre de 1 M. La diferencia entre cianuro libre y total es debida a la presencia de metales, que forman complejos con el cianuro. Los metales mayoritarios en este residuo fueron Fe 34,66 mM, Cu 285 Mm y Zn 147,5 mM. El pH del residuo fue superior a 13. Cuando se usó como fuente de nitrógeno, el residuo se diluyó en el medio de cultivo para dar la concentración de cianuro libre deseado, normalmente 2 mM.

El resto de reactivos empleados fueron de la máxima pureza disponible comercialmente. El agua destilada y bidestilada se obtuvo a partir de sistemas Milli-Ro y MilliQ, respectivamente, ambos de Millipore. Las manipulaciones que requerían esterilidad se llevaron a cabo en una cámara de flujo laminar Telstar PV 100 dotada de lámpara ultravioleta. Los espectrofotómetros utilizados durante este trabajo fueron Beckman (DU 7500) y ThermoSpectronic (Heliosε).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Análisis transcriptómico de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 en respuesta a cianuro

Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344 es una bacteria cianotrofa en la que se ha estudiado en detalle la resistencia y asimilación de cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2011a, c; Estepa *et al.*, 2012). Además, estudios proteómicos previos en este microorganismo han revelado que el cianuro puede afectar a otros procesos biológicos (Luque-Almagro *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta el momento se desconoce el efecto que el cianuro provoca sobre el transcriptoma de esta o de cualquier otra bacteria cianotrofa. La secuenciación completa del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Luque-Almagro *et al.*, 2013; Wibberg *et al.*, 2014) ha permitido analizar el transcriptoma de esta estirpe en condiciones de asimilación y resistencia a cianuro.

4.1.1. Diseño experimental, análisis de calidad y tratamiento estadístico de las matrices de DNA

Mediante micromatrices de ADN se llevó a cabo un análisis del transcriptoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 utilizando cuatro condiciones (NaCN, residuo-CN, NH₄Cl y -N) y cuatro réplicas biológicas para cada condición. Las células utilizadas en este estudio transcriptómico se precultivaron durante 24 horas en medio M9 con acetato sódico 50 mM como fuente de carbono y cloruro amónico 2 mM como fuente de nitrógeno. En este punto se adicionó a los distintos cultivos NaCN 2 mM, residuo cianurado de la joyería (CN⁻ 2 mM), NH₄Cl 2 mM o ninguna otra fuente de nitrógeno adicional (-N). Este momento se consideró el tiempo cero del experimento. Las células se recogieron cuando se encontraban activamente consumiendo la fuente de nitrógeno adicionada a tiempo cero; esto fue transcurridas 1,5 horas en el caso de las cuatro réplicas biológicas con amonio, y 8 horas para los cuatro cultivos con NaCN, residuo o -N. Como se observa en la figura 7, la concentración de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo cuando estos se recogieron fue de 600-800 µM en el caso de los cultivos con amonio o cianuro, mientras que

en el caso del residuo cianurado la concentración de cianuro en el momento de recoger las células fue 1 100-1 200 μM .

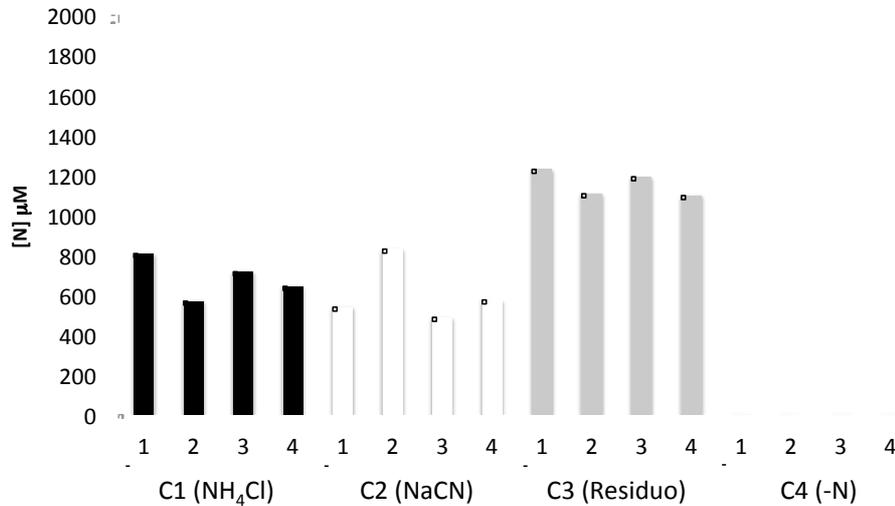


Figura 7: Concentración de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo. La concentración de las distintas fuentes de nitrógeno se determinó en el momento en el que se recogieron los cultivos para su análisis mediante micromatrices de DNA. Los números del 1 al 4 indican las réplicas biológicas, y C1-C4 son las 4 condiciones utilizadas.

El análisis transcriptómico se llevó a cabo utilizando micromatrices de DNA de dos colores (fluoróforos Cy5 y Cy3) de la casa comercial Agilent. Para evitar problemas de asimetría con los dos colores, se utilizó para cada comparación dos arrays con los colorantes intercambiados (*dye swapping*). El diseño del microarray fue en bucle o diseño en *loop*, donde se comparan dos condiciones a través de una cadena de condiciones sin necesidad de una muestra de referencia (Fig. 8), en el que se compararon las cuatro condiciones C1 (NH₄Cl), C2 (NaCN), C3 (Residuo-CN) y C4 (-N). Una vez extraído el RNA de todas las muestras se analizó su calidad mediante Tape Station utilizando el kit R6K ScreenTape (Agilent), determinándose la concentración y pureza del RNA mediante Nanodrop. Todas las muestras presentaron unos valores adecuados de concentración, pureza e integridad.

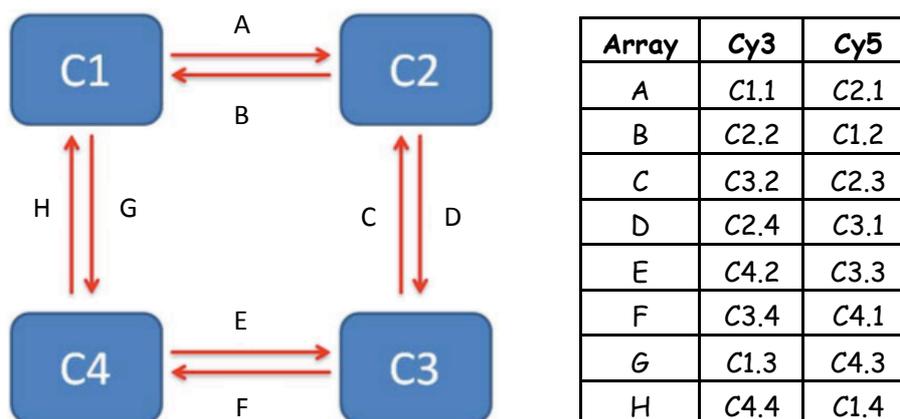


Figura 8: Diseño experimental de las micromatrices de DNA. Las flechas indican los arrays, representados en la tabla (derecha). La base de la flecha indica la condición que se marca con el fluoróforo Cy3 y la punta con el fluoróforo Cy5.

Para el marcaje se siguió el protocolo Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis v. 6.5 (Agilent), consiguiéndose para todas las muestras unos niveles de marcaje adecuados. Para el análisis de los resultados obtenidos se procedió en primer lugar a eliminar todos aquellos *spots* no válidos (outliers) según el software Feature Extraction v.10.7 (Agilent). El número de *spots* válidos utilizados posteriormente en el análisis se muestra en la figura 9.

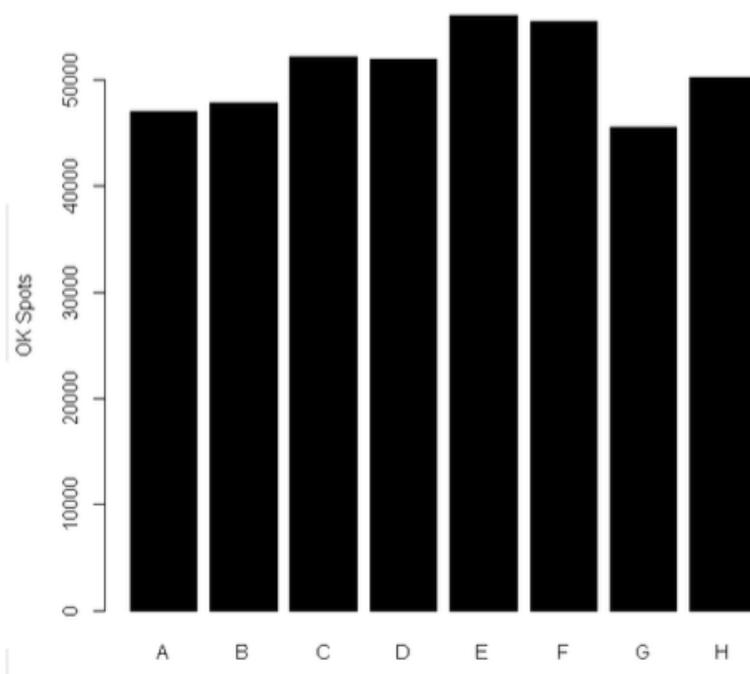


Figura 9: Número de *spots* válidos en las distintas matrices. Se muestra el número de *spots* después de eliminar los *spots* no válidos con el software Feature Extraction v.10.7 (Agilent). Las letras de los arrays (A-H) corresponden a la información de la figura 10.

El primer análisis que se llevó a cabo fue la evaluación de la calidad global de los microarrays. Para conocer la distribución de las señales en el chip, que debería ser similar en las distintas muestras, se representaron diagramas de densidades teniendo en cuenta la intensidad de los spots sin normalizar (Fig. 10A). La distribución normal y las formas similares de las curvas indican una buena calidad de los resultados. La pequeña desviación observada entre matrices indicó la necesidad de normalizar los datos. Por otro lado, la comparación de todos los valores M (relación entre la intensidad de los dos canales) de los distintos arrays (Fig. 10B) también puso de manifiesto la necesidad de una normalización de los datos, si bien todas las cajas fueron bastante homogéneas y alrededor de 0. Finalmente, para identificar problemas durante la hibridación y/o lavado se analizaron los valores de fondo de las matrices, obteniéndose en todos los casos una imagen de fondo aceptable (resultados no mostrados).

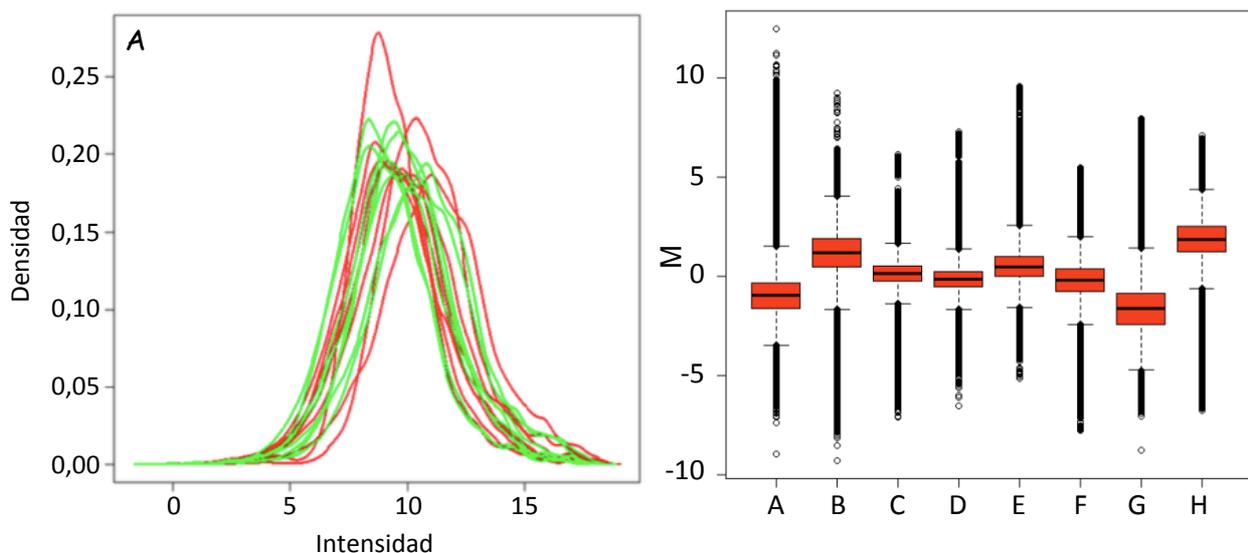


Figura 10: Análisis de las intensidades de los distintos arrays. (A) Representación de la distribución de intensidades sin normalizar. En rojo y verde se representan los dos canales. (B) Diagrama de cajas de los valores brutos de intensidad de cada array. Se indica la distribución estadística de los valores obtenidos en los arrays, indicándose los valores máximo y mínimo, los percentiles 25 y 75, y la mediana.

Para estimar y eliminar la intensidad de ruido de fondo y poder comparar unas muestras con otras, los datos brutos de intensidad fueron sometidos a un tratamiento estadístico consistente en la sustracción o corrección del fondo (background) y una posterior normalización. Para la sustracción del fondo se utilizó el método *normexp* con *offset* = 30, obteniéndose unos resultados satisfactorios. Posteriormente, se llevó a cabo una normalización intra-array, utilizada para corregir los sesgos en el marcaje de Cy5 y

Cy3, y una normalización inter-array, necesaria a fin de hacer todos los datos comparables. Para la normalización intra-array se utilizó el método *loess* y para la normalización inter-array se utilizó el método *Aquantile*. Después de este tratamiento de los datos, el gráfico de densidades mostró que todos los arrays y todos los canales tenían una misma distribución (Fig. 11), y la representación de los valores M fue más homogénea (Fig. 12).

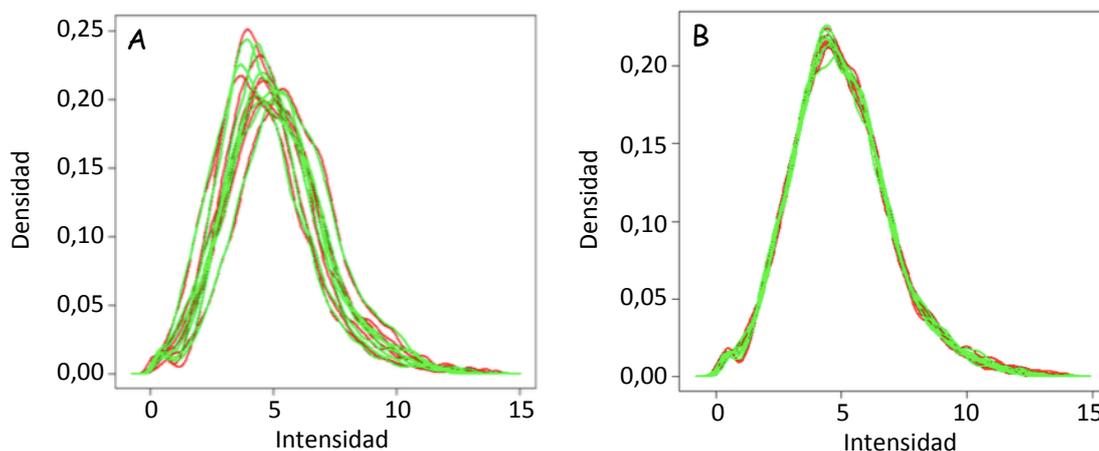


Figura 11: Representación de la distribución de intensidades normalizadas. La normalización se realizó intra-array (A) y posteriormente inter-array (B). En rojo y verde se representan los dos canales.

Una vez normalizados los datos, los gráficos MA de todas las matrices presentaron una distribución aceptable (Fig. 13). En estos gráficos se representa la relación existente entre la proporción de la intensidad de los dos canales (M), y la media de intensidad (A).

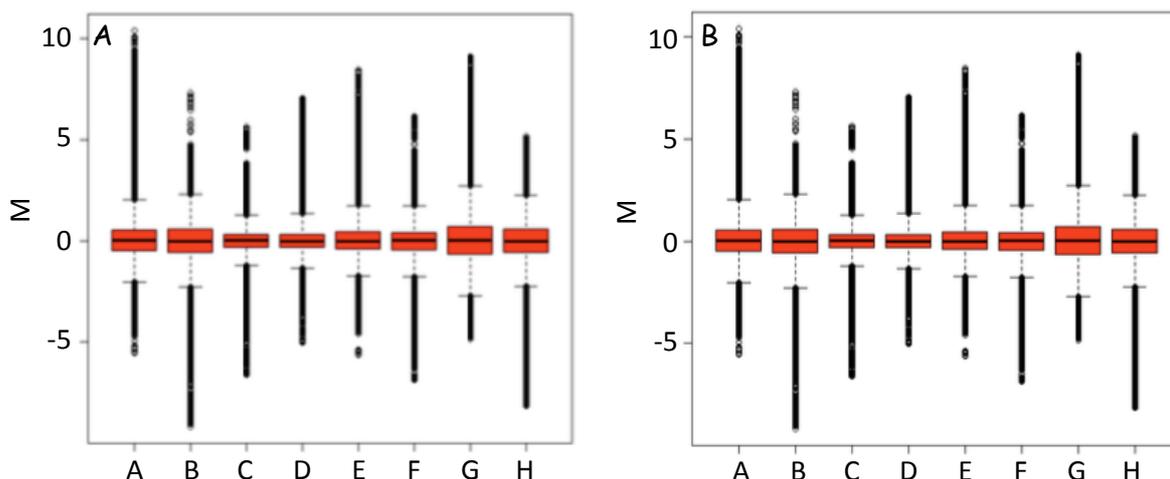


Figura 12: Diagrama de cajas de los valores de intensidad de cada array después de la normalización. Intra-array (A) e inter-array (B).

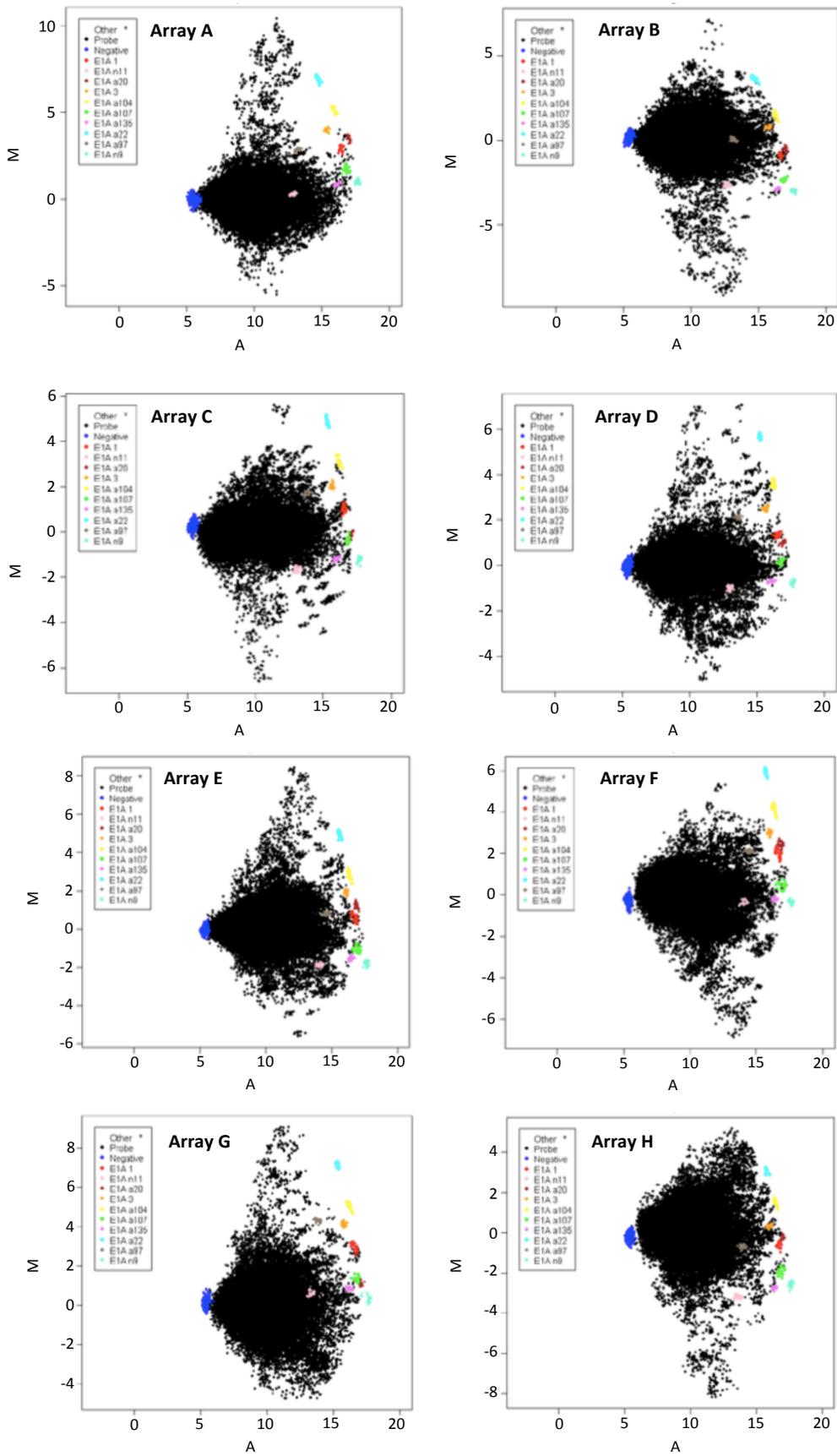


Figura 13: Gráficos MA de cada array. En estos gráficos se representa M [$\log_2 (R/G)$] frente a A [$1/2 \log_2 (R \times G)$].

4.1.2. Análisis estadístico de los datos de microarray

En un análisis de componentes principales (PCA) realizado a partir de los datos normalizados se pudo explicar el 71% de la varianza total, de la que el 41% se debió a la fuente de nitrógeno (eje X) y el 20% a la presencia/ausencia de cianuro (eje Y). Además, en este análisis las cuatro réplicas biológicas de cada condición se agruparon entre sí (Fig. 14). Estos resultados confirmaron la validez de las muestras utilizadas y del experimento.

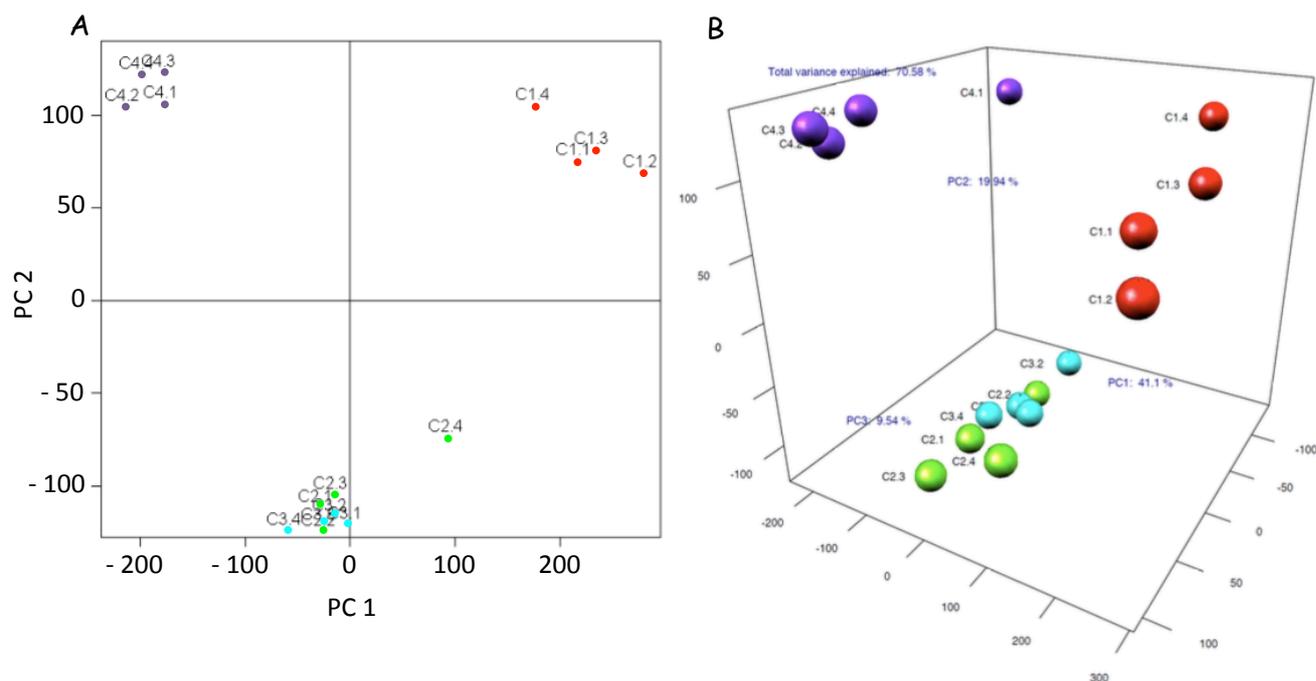


Figura 14: Análisis de componentes principales de los arrays. (A) Gráfico de las dos primeras componentes principales. Se muestran para los datos normalizados de los microarrays. C1.1-C1.4, amonio; C2.1-C2.4, NaCN; C3.1-C3.4, Residuo-CN; C4.1-C4.4, -N. (B) Representación 3D del análisis de componentes principales. Este análisis se ha realizado con los datos normalizados de los microarrays. C1.1-C1.4, amonio; C2.1-C2.4, NaCN; C3.1-C3.4, Residuo-CN; C4.1-C4.4, -N.

El estudio de la agrupación de los datos normalizados, utilizando el método de ward pearson, o de 12 582 sondas pertenecientes a genes con expresión diferencial significativa ($\log_{FC} > 1$ o < -1 , valor- p ajustado $< 0,05$) usando clústers jerárquicos confirmó un agrupamiento según los grupos experimentales (Fig. 15).

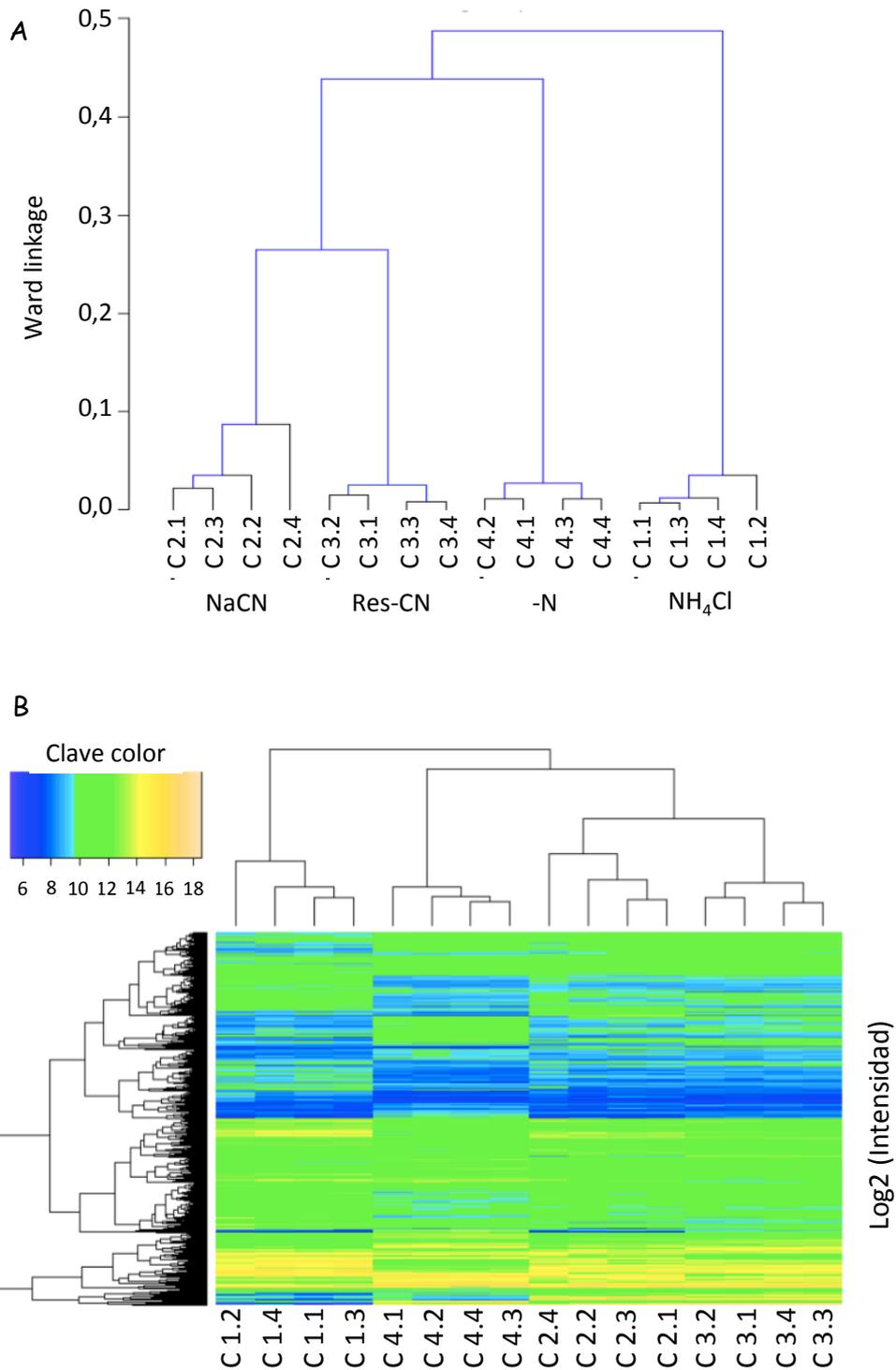


Figura 15: Agrupación de los datos obtenidos en los microarrays. (A) Agrupación de las muestras de microarrays en base a un clúster jerárquico realizado según el método de ward pearson. (B) Agrupación de 12 582 sondas pertenecientes a genes con expresión diferencial significativa ($\log_{2}FC > 1$ o < -1 , valor- p ajustado $< 0,05$) en base a un clúster jerárquico.

4.1.3. Análisis de la expresión génica

Con el objetivo de identificar los genes con expresión diferencial significativa, los datos normalizados se ajustaron a un modelo lineal con el programa Limma (Bioconductor). Para ello, se eliminaron las sondas control, construyéndose la matriz de diseño y extrayéndose el contraste de interés. Considerando amonio como la condición control de referencia, y los genes con expresión diferencial aquellos con un logFC superior a 1 (inducción) o inferior a -1 (represión) y un valor p ajustado inferior a 0,05 (95% de confianza estadística), se obtuvo que el NaCN afectó a la expresión de 709 genes de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (17% del total de genes), mientras que el residuo cianurado afectó a un número ligeramente superior (884 genes, 21%). El mayor número de genes cuya transcripción se vio afectada fue en condiciones de -N (1 445 genes, 35%) (Fig. 16A). De los genes afectados por alguna de las tres condiciones, aproximadamente el número de genes inducidos y reprimidos fue similar (Fig. 16B).

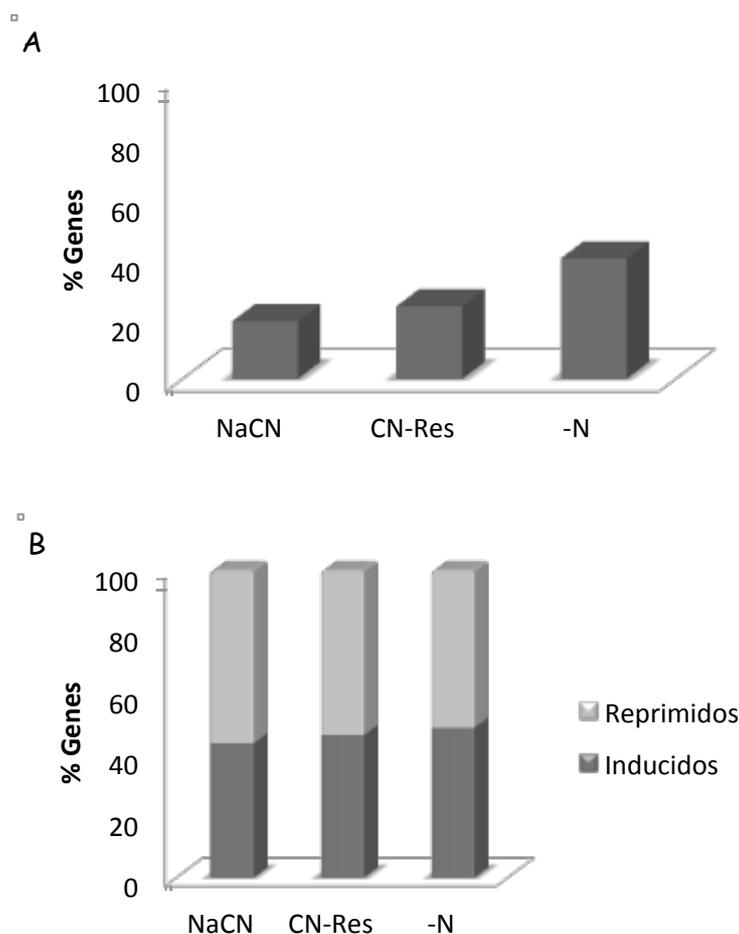


Figura 16: Genes afectados por NaCN, residuo o -N respecto a NH_4Cl . (A) Los datos se representan en porcentaje del total de genes de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 que contiene el genoma de esta estirpe. (B) Genes inducidos y reprimidos en NaCN, residuo o -N respecto a NH_4Cl como control.

El análisis específico de las intersecciones de los contrastes de las tres condiciones NH_4^+ vs NaCN, residuo y hambre de nitrógeno, permitió identificar los genes comunes a los tres contrastes, a cada par y los exclusivos de cada uno. Los resultados obtenidos se muestran en el diagrama de Venn de la figura 17.

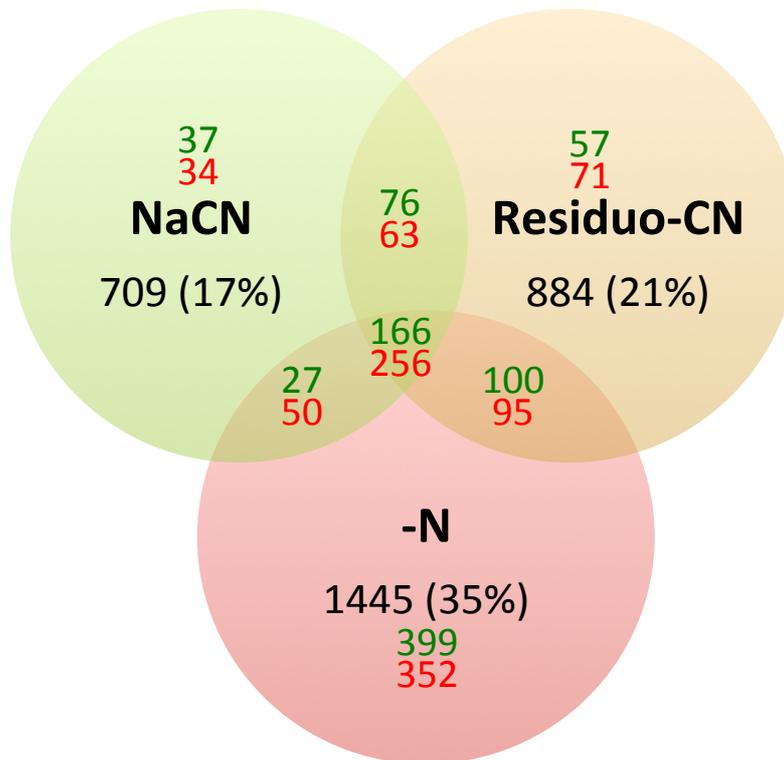


Figura 17. Diagrama de Venn con el número de genes afectados específicamente por NaCN, residuo o -N, o compartidos. Como control se utilizó el transcriptoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en amonio. En este diagrama los genes sobreexpresados (verde) presentaron una expresión $\geq 2,1$ veces respecto al control, y los genes reprimidos presentaron una expresión $\leq 2,1$ veces respecto al control. Sólo se consideraron los genes con un valor $p \leq 0,01$.

De los genes afectados por alguna de las tres condiciones, tanto de forma específica como en alguna de las intersecciones, el número de genes inducidos y reprimidos fue aproximadamente similar, excepto en la intersección central (NaCN/residuo/-N) y la intersección NaCN/-N, que presentaron un número de genes reprimidos significativamente mayor que el número de genes inducidos. Entre los genes afectados por NaCN/residuo/-N el 61% se reprimieron y el 39% se indujeron, mientras que entre los genes afectados por NaCN/-N se reprimieron el 65% de genes y se indujeron el 35%.

4.1.4. Análisis funcional de las micromatrices de DNA

Para estudiar los procesos biológicos afectados por cianuro, residuo o -N, a nivel de expresión génica, se llevó a cabo un análisis funcional de los genes expresados diferencialmente en las distintas condiciones respecto a amonio (control) mediante un enriquecimiento de términos *GO* (*Gene Ontology*). Para ello, se utilizó un test hipergeométrico con un valor *p* inferior a 0,01. Se consideraron sólo los términos *GO* que están representados en el genoma por al menos 10 genes, y de éstos sólo los términos sobrerrepresentados que contengan al menos 2 genes. Los resultados obtenidos pueden consultarse en la dirección de Internet <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.09.032>. Un análisis comparativo de los términos *GO* enriquecidos identificados reveló algunos términos específicos para cada condición (Tabla 13), tanto para genes inducidos como reprimidos, dentro de la categoría "función molecular" (*GO:0003674*).

Tabla 13: Términos *GO* enriquecidos, pertenecientes a la categoría "función molecular", específicos de cianuro, residuo o hambre de nitrógeno respecto a amonio.

Muestra	
NaCN	INDUCIDOS
	Actividad transaminasa
	Actividad transferasa hidroximetil-, formil- y relacionada
	Actividad ATPasa de transporte-transmembrana de sulfato
	Actividad oxidoreductasa que actúa sobre grupos de donadores aldehído u oxo
	REPRIMIDOS
	Actividad CoA carboxilasa
	Actividad ligasa de aminoácidos
	Actividad transmembrana transportadora de macromoléculas
	Actividad ATPasa acoplada a sustancias transmembrana
Residuo	INDUCIDOS
	Actividad transmembrana transportadora de aniones inorgánicos
	Actividad oxidoreductasa que actúa sobre otros compuestos nitrogenados como donadores
	REPRIMIDOS
	Actividad Acil-CoA deshidrogenasa
	Actividad transferasa que transfiere grupos amino-acilo y otros grupos acilo
	Actividad racemasa y epimerasa
Actividad ligasa que forma enlaces C-C	
Actividad ATPasa transportadora de cationes	
-N	INDUCIDOS
	Unión a DNA
	Actividad DNA polimerasa dirigida por RNA
	Actividad transposasa
	REPRIMIDOS
	Unión a tRNA
	Actividad factor de elongación de la traducción
	Actividad peptidil-prolil <i>cis-trans</i> isomerasa
	Actividad aminoacil-tRNA ligasa
Unión a ATP	

	Actividad oxidorreductasa que actúa sobre donadores del grupo CH-OH, y con NAD ⁺ o NADP ⁺ como aceptor
	Actividad oxidorreductasa que actúa sobre donadores del grupo oxo o aldehído, y con NAD ⁺ o NADP ⁺ como aceptor
	Actividad carbono-carbono liasa
	Actividad ligasa de formación de puentes carbono-nitrógeno
	Unión ión manganeso
	Unión proteína no plegada

En la tabla 14 se muestran genes inducidos y reprimidos, dentro de la categoría "proceso biológico" (GO:0008150).

Tabla 14: Términos GO enriquecidos, pertenecientes a la categoría "proceso biológico", específicos de cianuro, residuo o hambre de nitrógeno utilizando amonio como control.

Muestra	
NaCN	INDUCIDOS
	Metabolismo de la glicina, biosíntesis de alfa aminoácidos
	Metabolismo de compuestos que contienen ácido fólico
	Transporte de sulfato
	Oxidación-reducción
	REPRIMIDOS
	Transporte de poliaminas
Metabolismo del ATP	
Residuo	INDUCIDOS
	Transporte de aniones inorgánicos, transporte de compuestos nitrogenados
-N	INDUCIDOS
	Transducción de la señal, regulación metabólica
	Replicación del DNA dependiente de RNA
	Transposición mediada por DNA
	REPRIMIDOS
	Aminoacilación de tRNA para traducción de proteína
	Elongación de la traducción
	Síntesis de ATP acoplada a transporte de electrones
	Plegamiento proteínas

Por otro lado, algunos términos GO enriquecidos en este análisis fueron compartidos por dos o tres condiciones (Tabla 15). Entre estos, los GO de "unión a cobre", "unión a centros Fe-S" y "unión a piridoxal fosfato" fueron exclusivos de cianuro.

Tabla 15: Términos *GO* enriquecidos, pertenecientes a la categoría "función biológica", compartidos por dos o tres condiciones con respecto a amonio.

	NacN	Residuo	-N
INDUCIDOS			
Unión cobre	+	+	
Unión centros hierro-azufre	+	+	
Unión piridoxal fosfato	+	+	
Actividad motora		+	+
REPRIMIDOS			
Constituyente estructural del ribosoma	+	+	+
Actividad transportadora transmembrana de ión hidrógeno	+	+	+
Unión a rRNA	+	+	+
Unión ión magnesio		+	+
NADH deshidrogenasa (ubiquinona)		+	+
Unión NAD ⁺		+	+

El enriquecimiento de términos *GO* nos permite tener una visión global de los procesos biológicos que ocurren en unas condiciones determinadas. Sin embargo, la clasificación funcional de todos los genes afectados en unas condiciones no detalla a nivel funcional esa visión obtenida previamente. Por lo tanto, para profundizar en los resultados previos se procedió a la clasificación funcional de los genes afectados por NaCN, residuo o -N, usando amonio como control. Entre los genes afectados por cianuro (NaCN y residuo), un porcentaje muy elevado correspondió a genes de función desconocida (21%), seguido de genes que participan en el transporte y metabolismo de aminoácidos (12%) (Fig. 18A). Entre los primeros, la mayoría fueron genes reprimidos por cianuro, mientras que por el contrario, entre los genes de transporte y metabolismo de aminoácidos la mayor parte correspondió a genes inducidos por cianuro (Fig. 18B). La clasificación funcional de los genes afectados exclusivamente por NaCN se muestra en la figura 19A. En este caso también la mayoría de genes se clasificaron dentro de función desconocida (23%) y del transporte y metabolismo de aminoácidos (17%) (Fig. 19B). En el caso de los genes afectados exclusivamente por el residuo cianurado, además de los genes de función desconocida (22%), la siguiente categoría con mayor número de genes afectados fue la de transporte y metabolismo de iones inorgánicos (Fig. 20).

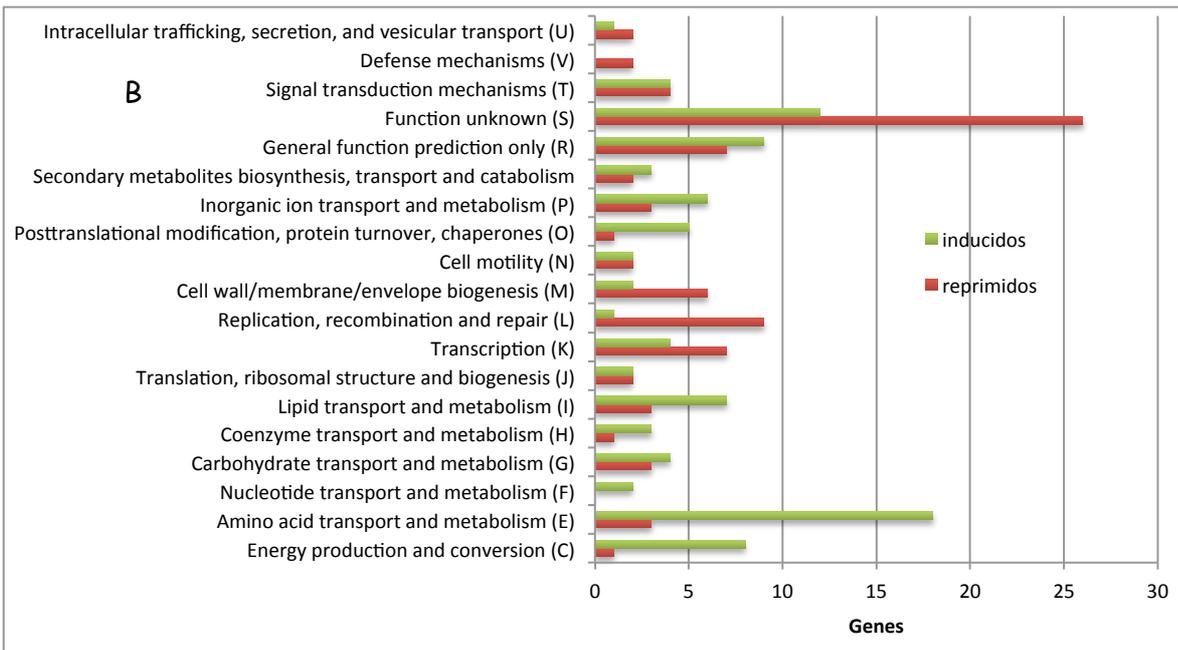
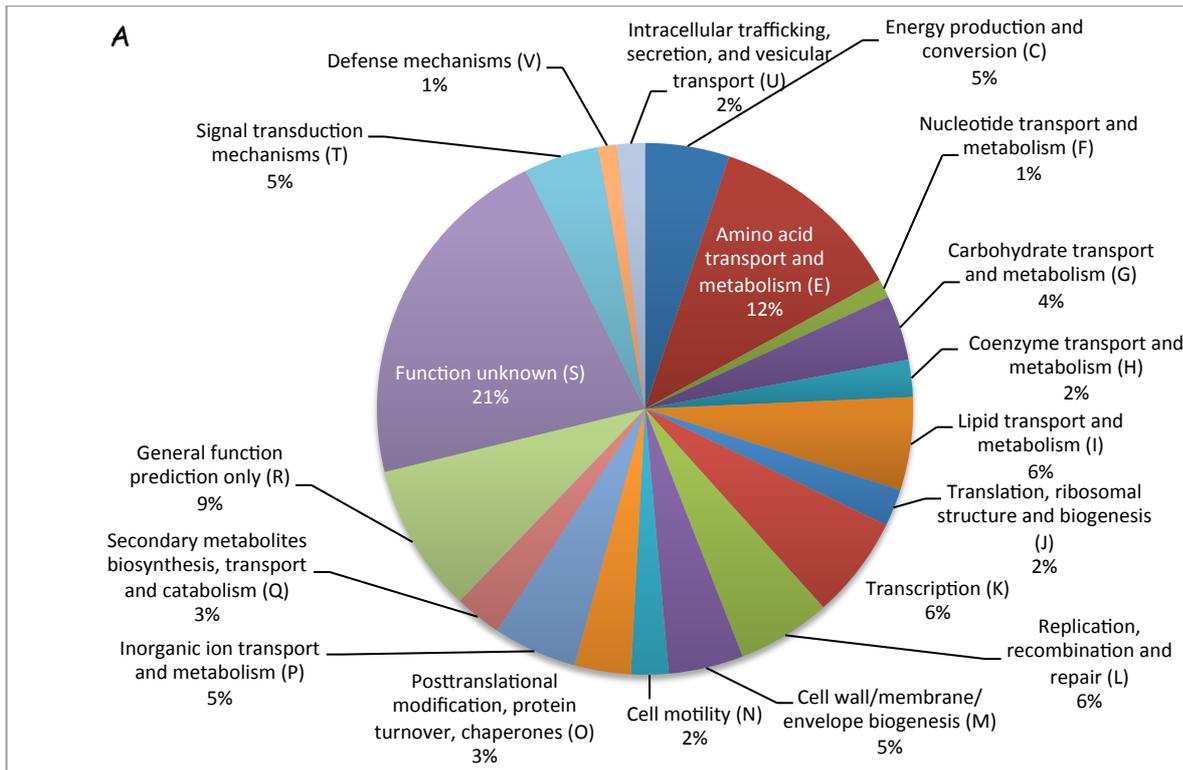


Figura 18: Clasificación funcional de genes afectados por cianuro sódico y residuo joyero con respecto a amonio. Esta clasificación se llevó a cabo a través de la base de datos de grupos ortólogos y anotación funcional EggNOGG 4.5 (<http://eggnogdb.embl.de/#/app/home>). (B) Clasificación funcional de genes inducidos o reprimidos por cianuro. Esta clasificación se llevó a cabo a través de la base de datos de grupos ortólogos y anotación funcional EggNOGG 4.5 (<http://eggnogdb.embl.de/#/app/home>).

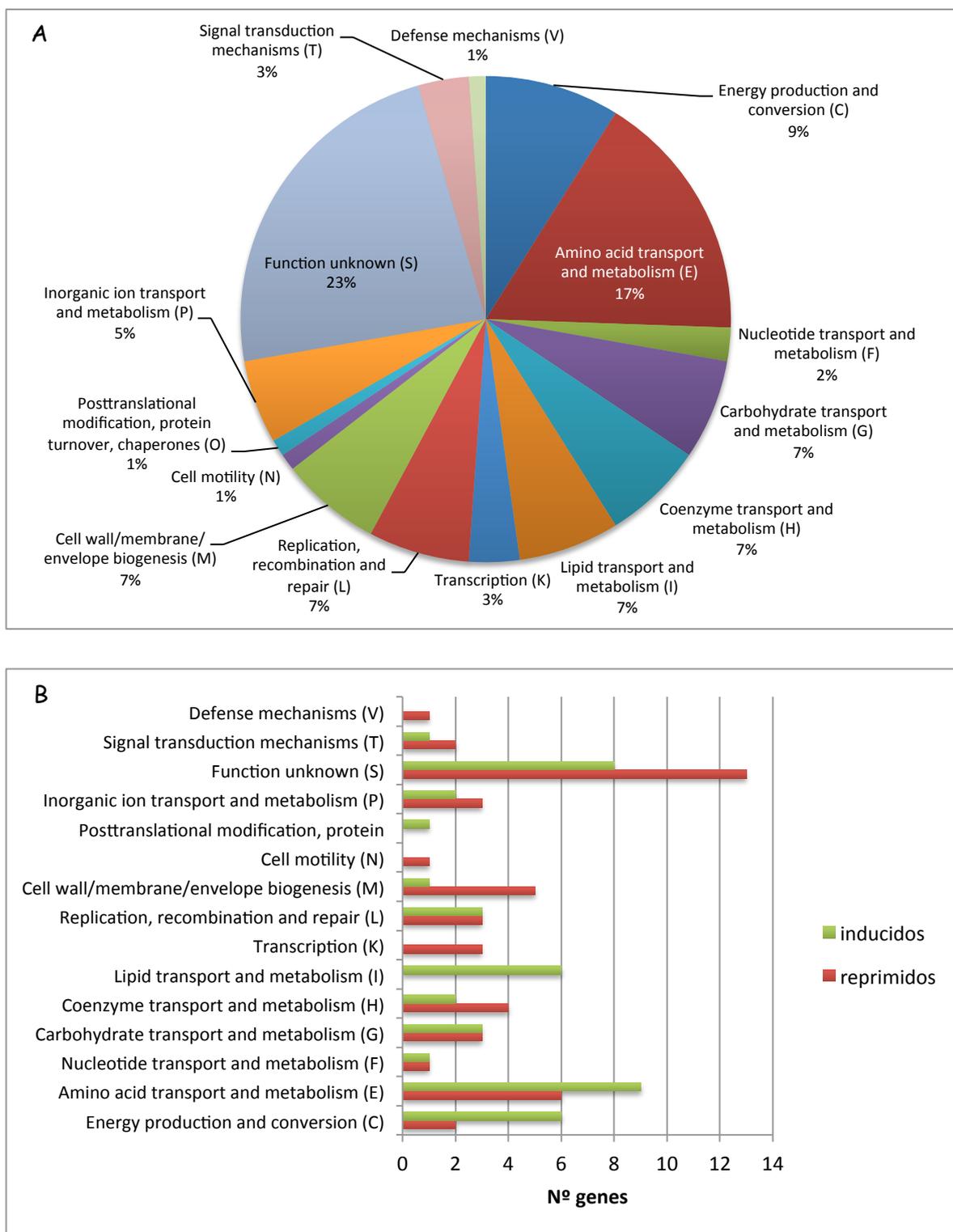


Figura 19: Clasificación funcional de genes exclusivamente afectados por NaCN. (A) Esta clasificación se llevó a cabo a través de la base de datos de grupos ortólogos y anotación funcional EggNOGG 4.5 (<http://eggnogdb.embl.de/#/app/home>). (B) Clasificación funcional de genes exclusivamente inducidos o reprimidos por NaCN. Esta clasificación se llevó a cabo a través de la base de datos de grupos ortólogos y anotación funcional EggNOGG 4.5 (<http://eggnogdb.embl.de/#/app/home>).

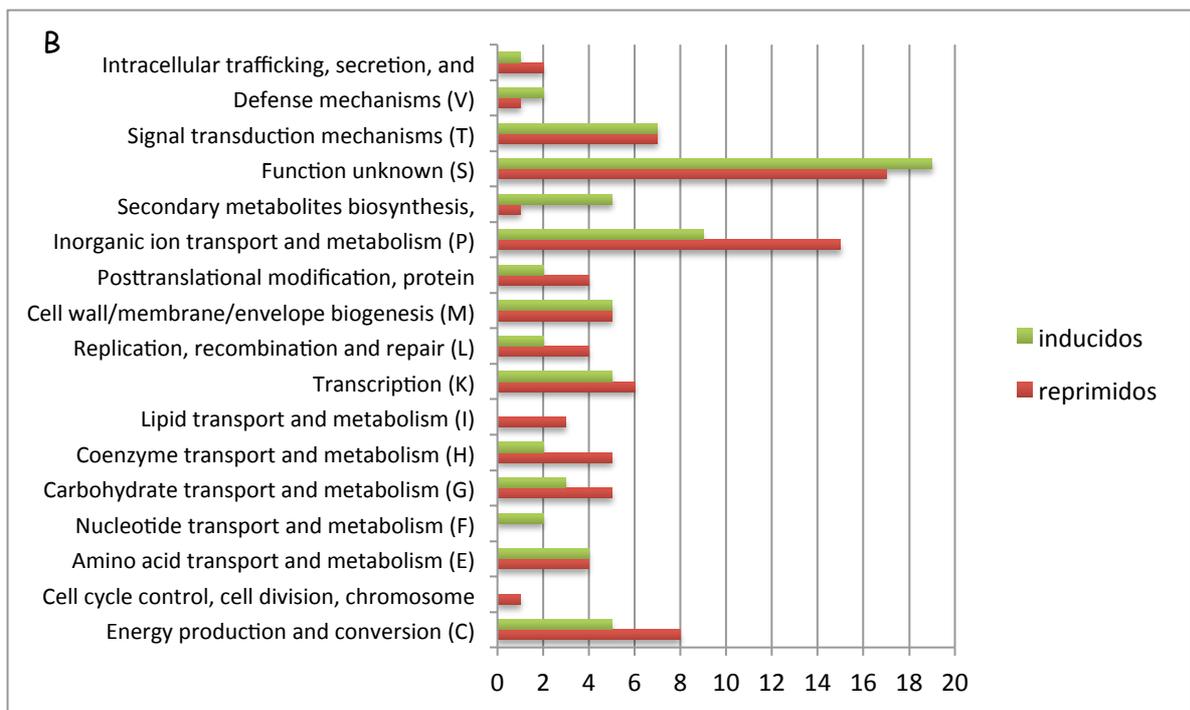
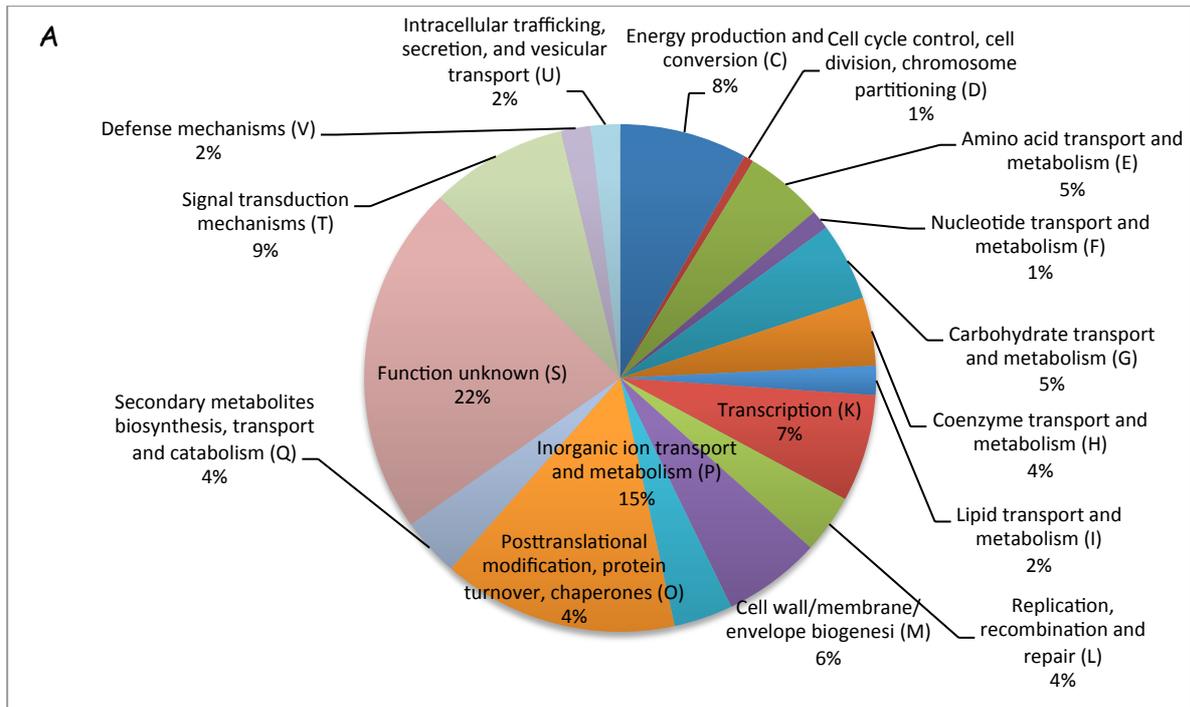


Figura 20: Clasificación funcional de genes exclusivamente afectados por residuo cianurado procedente de la industria joyera. (A) Esta clasificación se llevó a cabo a través de la base de datos de grupos ortólogos y anotación funcional EggNOG 4.5 (<http://eggno gdb.embl.de/#/app/home>). (B) Clasificación funcional de genes exclusivamente inducidos o reprimidos por residuo cianurado. Esta clasificación se llevó a cabo a través de la base de datos de grupos ortólogos y anotación funcional EggNOG 4.5 (<http://eggno gdb.embl.de/#/app/home>).

4.1.5. Algunos genes de interés afectados por limitación de nitrógeno, NaCN o residuo

Como se comentó anteriormente, la limitación de nitrógeno ocasionó considerables cambios de expresión génica en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en comparación con amonio. De los 1 445 genes afectados, en la tabla 16 se presentan algunos genes de interés.

Tabla 16: Algunos genes de interés afectados en condiciones de -N.

en ID ^a	Anotación (función/nombre del gen)	log ₂ FC	Valor-p
BN5_0139	ABC-type amino acid transport/signal transduction systems, periplasmic component (<i>glnH</i>)	2,225	2,0E-11
BN5_0140	ABC-type amino acid transport system, permease component (<i>glnP1</i>)	2,564	2,1E-11
BN5_0141	ABC-type amino acid transport system, permease component (<i>glnP3</i>)	1,379	2,0E-09
BN5_1009	ABC-type polar amino acid transport system, ATPase component (<i>aapP</i>)	1,162	4,2E-08
BN5_0142	ABC-type polar amino acid transport system, ATPase component (<i>glnQ</i>)	2,101	9,1E-10
BN5_3231	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, periplasmic component	2,649	2,5E-11
BN5_3113	Cyanate permease (<i>cynX</i>)	1,117	1,1E-06
BN5_0499	Membrane transporter of cations and cationic drugs	1,582	9,5E-08
BN5_2691	Permease of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily	1,277	3,0E-07
BN5_2416	Fe ²⁺ -dicitrate sensor, membrane component (<i>fecR</i>)	1,244	5,7E-05
BN5_3557	ABC-type multidrug transport system, ATPase component	1,333	3,2E-08
BN5_3747	Mn ²⁺ and Fe ²⁺ transporter of the NRAMP family	1,292	2,5E-06
BN5_4476	Mercuric ion transport (<i>merT5</i>)	1,983	2,1E-10
BN5_1137	Ammonia permease (<i>amt</i>)	1,984	3,4E-10
BN5_0438	Transcriptional regulator containing PAS and DNA-binding domain (<i>cynF</i>)	1,419	7,2E-07
BN5_0178	Nitrogen regulatory protein PII (<i>glnK</i>)	3,488	8,6E-13
BN5_3961	NtrB signal transducer, responds to the nitrogen level and modulates NtrC activity (<i>ntrB</i>)	2,728	7,8E-11
BN5_3962	Nitrogen response regulator containing DNA-binding domain (<i>ntrC3</i>)	2,596	4,9E-13
BN5_4425	Transcriptional regulator. Nodulation protein D1 (<i>mexT5</i>)	1,332	1,6E-06
BN5_0781	Transcriptional regulators (MocR family)	1,621	5,2E-09
BN5_2516	Glutamate synthase	1,713	1,5E-09
BN5_2542	Aconitase A (<i>acnA</i>)	1,081	2,6E-06
BN5_1500	Carbon storage regulator, Global regulator protein family (<i>csrA</i>)	1,418	9,3E-06
BN5_3204	Aliphatic amidase with a restricted substrate specificity, hydrolyzes formamide (<i>amiF</i>)	2,373	8,3E-13
BN5_3668	Bacterioferritin (<i>bfr</i>)	1,507	1,2E-09
BN5_0360	Glutathione S-transferase	1,464	1,5 E-07
BN5_1595	Glutathione peroxidase	1,319	2,5 E-08
BN5_0763	CRISPR-associated helicase Cas3 involved in defense mechanisms	1,251	3,7E-08
BN5_0150	Cytochrome c, mono- and diheme variants (<i>cccA</i>)	1,115	4,2E-08
BN5_1586	Cobalamin biosynthesis protein (<i>cobD/cbiB</i>)	1,591	2,3E-08
BN5_4374	Cobalamin biosynthesis protein (<i>cobK</i>)	1,218	4,3E-08
BN5_3669	Catalase-peroxidase I (<i>katG</i>)	1,563	4,0E-10
BN5_1467	Molybdenum cofactor biosynthesis enzyme (<i>moaA1</i>)	1,177	3,3E-09
BN5_2778	Uncharacterized protein involved in formation of periplasmic nitrate reductase (<i>napD</i>)	1,258	9,1E-06
BN5_0412	Poly(3-hydroxyalkanoate) synthetase (<i>phaC2</i>)	2,358	5,6E-10
BN5_0410	Poly(hydroxyalkanoate) granule associated protein (<i>phaF1</i>)	3,355	7,1E-13
BN5_4096	Poly(hydroxyalkanoate) granule associated protein (<i>phaP</i>)	1,874	2,3 E-09
BN5_0413	Predicted hydrolase or acyltransferase (alpha/beta hydrolase superfamily) (<i>phaZ</i>)	1,554	4,3E-09
BN5_3102	SAM-dependent methyltransferase (<i>ubiG3</i>)	1,465	6,5E-09
BN5_0581	Urea amidohydrolase (urease) gamma subunit (<i>ureA</i>)	1,814	1,9E-10
BN5_0578	Urea amidohydrolase (urease) alpha subunit (<i>ureC</i>)	1,443	9,5E-10
BN5_0554	Putative gene involved in urea metabolism (<i>ureE</i>)	2,946	6,9E-13
BN5_0551	Hydrogenase/urease accessory gene (<i>ureJ</i>)	2,328	2,1E-11
BN5_4078	ABC-type polar amino acid transport system, ATPase component	-2,215	7,8E-13
BN5_4080	ABC-type amino acid transport system, permease component	-1,646	2,5E-07
BN5_4081	ABC-type amino acid transport system, permease component	-1,667	5,8E-07
BN5_0814	Cation/multidrug efflux pump (<i>ttgB</i>)	-1,298	2,5E-06

Resultados

BN5_2733	Predicted exporter of the RND superfamily	-1,858	6,8E-08
BN5_2616	ABC-type transport system involved in cytochrome <i>c</i> biogenesis (<i>ccmC</i>)	-1,078	7,1E-07
BN5_4325	ABC-type metal ion transport system, permease component (<i>metI</i>)	-1,189	2,8 E-05
BN5_4326	ABC-type metal ion transport system, periplasmic component (<i>metQ</i>)	-3,823	1,8E-10
BN5_0341	Predicted transcriptional regulator (<i>arsR3</i>)	-1,396	4,6E-06
BN5_2792	Phosphoribosylaminoimidazole (AIR) synthetase (<i>purM</i>)	-1,544	1,8E-05
BN5_1068	Formate-dependent phosphoribosylglycinamide formyltransferase GAR (<i>purT</i>)	-1,420	9,5E-09
BN5_4231	NAD(P)H-nitrite reductase (<i>rubB</i>)	-2,014	1,7 E-09
BN5_1676	Phosphoserine aminotransferase (<i>serC1</i>)	-1,538	2,5E-10
BN5_2026	Sulfite reductase, beta subunit (<i>sir</i>)	-2,507	6,2E-12
BN5_3036	Peroxiredoxin (<i>ahpC1</i>)	-1,664	1,3E-08
BN5_3035	Alkyl hydroperoxide reductase, large subunit (<i>ahpF</i>)	-1,085	2,8E-07
BN5_2615	Putative gene involved in cytochrome <i>c</i> biogenesis (<i>ccmD</i>)	-1,256	2,4E-07
BN5_2614	Cytochrome <i>c</i> -type biogenesis protein (<i>ccmE</i>)	-1,557	6,7E-11
BN5_2613	Cytochrome <i>c</i> biogenesis factor (<i>ccmF</i>)	-1,643	3,3E-11
BN5_2610	Cytochrome <i>c</i> biogenesis factor (<i>ccmH</i>)	-2,109	2,9E-11
BN5_1342	Cbb3-type cytochrome oxidase, subunit 1 (<i>ccoN1</i>)	-1,259	9,6E-07
BN5_4400	Precorrin-4 methylase (<i>cobM</i>)	-1,153	2,8E-04
BN5_1592	Cobalamin-5-phosphate synthase (<i>cobS</i>)	-1,109	7,9 E-05
BN5_0743	Putative Mg ²⁺ and Co ²⁺ transporter (<i>corC</i>)	-1,183	5,2 E-08
BN5_0325	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (<i>metF1</i>)	-2,022	2,5E-10
BN5_2035	Methionine synthase I, cobalamin-binding domain (<i>metH</i>)	-1,207	5,1E-07

^a Gen ID según el número de acceso HG916826 (Wibberg *et al.*, 2014)

Entre los genes inducidos en condiciones de limitación de nitrógeno se encontraron genes cuyos productos favorecen la utilización de diversas fuentes de nitrógeno, incluidos transportadores de aminoácidos y genes de utilización de urea. También, se indujeron en estas condiciones reguladores que participan en el control general del metabolismo del nitrógeno (NtrBC y PII) o en la regulación de rutas específicas de asimilación de nitrógeno (CynF, regulador asimilación cianato) y genes relacionados con la síntesis de polihidroxicanoatos. Entre los genes reprimidos por -N, se identificaron genes que codifican transportadores de aminoácidos como la metionina, y genes que participan en la biogénesis de citocromos.

En la tabla 17 se incluyen algunos genes de interés y su nivel de expresión en las tres condiciones estudiadas respecto al control con amonio.

Tabla 17: Comparación de la expresión de algunos genes de interés en las distintas condiciones de estudio.

Gen ID ^a	Anotación (función/nombre del gen)	CN ⁻ -NH ₄ ⁺ log ₂ FC	WW-NH ₄ ⁺ log ₂ FC	N-NH ₄ ⁺ log ₂ FC	CN- NH ₄ ⁺ valor-p	WW-NH ₄ ⁺ valor-p	N-NH ₄ ⁺ valor-p
BN5_1902	Cytochrome <i>bd</i> ubiquinol oxidase (<i>cioA3</i>)	8,128	7,702	1,151	3,1E-12	3,0E-12	2,9E-3
BN5_1634	GCN5-related N-acetyltransferase	7,653	9,954	7,164	1,8E-12	1,2E-13	4,5E-12
BN5_1632	NitC, Nitrilase/cyanide hidratase (<i>nit2/nitC</i>)	6,482	9,394	6,292	9,9E-11	8,0E-13	1,3E-10
BN5_0442	Cyanate lyase, cyanate hydratase (<i>cyn5</i>)	6,243	9,156	4,112	2,7E-07	1,1E-09	8,4E-06
BN5_1899	PLP-dependent, GntR-regulator (<i>mocr</i>)	6,041	5,912	1,574	4,5E-13	3,2E-13	1,6E-06
BN5_1353	Cytochrome <i>c</i> oxidase <i>cbb3</i> type (<i>cco6</i>)	5,804	5,879	1,618	2,2E-14	1,4E-14	1,0E-08
BN5_0439	ABC-type cyanate transporter (<i>cynA</i>)	5,695	10,330	5,867	9,6E-08	2,9E-11	4,2E-08
BN5_1892	LysR, substrate-binding	5,311	5,226	1,520	1,0E-12	6,8E-13	9,4E-07
BN5_0441	ABC-type cyanate transporter (<i>cynD</i>)	5,152	9,356	5,351	2,6E-08	8,3E-12	6,6E-09
BN5_2689	Pyruvate ferredoxin/ flavodoxin (<i>iorA1</i>)	4,580	4,226	1,666	2,8E-10	4,3E-10	1,4E-05
BN5_2413	PLP-dependent aminotransferase	4,553	4,546	4,007	1,3E-07	1,3E-08	1,7E-07
BN5_0440	ABC-type cyanate transporter (<i>cynB</i>)	4,202	8,812	4,185	3,1E-06	1,9E-10	9,2E-07
BN5_0329	Glutamate synthase-GOGAT (<i>gltD1</i>)	2,907	3,087	5,773	2,7 E-4	1,5 E-4	8,5E-08
BN5_1638	Isocitrate dehydrogenase (<i>aceK</i>)	2,523	3,782	1,789	2,7E-06	1,2E-08	7,8E-06
BN5_2309	Glutamine synthetase-GS (<i>glnA5</i>)	2,383	2,512	3,199	1,6E-07	5,3E-08	1,6E-10
BN5_2268	Biotine synthase	2,195	1,037	1,063	1,0E-08	2,5E-05	1,3E-05
BN5_2535	Bacterial regulatory protein, MarR	2,160	2,427	3,093	7,6E-10	9,4E-11	1,1E-11
BN5_2414	Bacterial regulatory protein, MarR	2,068	2,456	1,661	5,2E-08	3,3E-09	1,6E-07
BN5_1587	PLP-dependent aminotransferase (<i>cobC</i>)	2,068	3,852	1,357	5,6E-08	1,2E-11	2,1E-06
BN5_1338	LysR, GntR transcriptional regulators (<i>gstr</i>)	1,868	1,620	2,122	9,5E-07	2,3E-06	6,7E-08
BN5_3729	FeS cluster assembly	1,762	2,440	1,579	1,3E-06	7,6E-09	7,2E-07
BN5_3269	ISC system trasnscription regulator (<i>iscR</i>)	1,714	2,718	1,667	7,5E-06	2,0E-08	3,1E-06
BN5_1807	Biotin/lipoyl, RND family efflux transporter	1,494	1,003	1,244	2,2 E-4	2,2E-05	1,5E-06
BN5_2308	PLP-dependent aminotransferase	1,410	1,705	1,488	3,5E-07	1,9E-08	5,9E-08
BN5_0594	Bacterial regulatory proteins, gntR family	1,202	1,708	3,357	1,7 E-4	3,2E-06	4,8E-11
BN5_1373	Pyruvate kinase	1,197	1,441	2,208	2,5E-05	2,1E-06	1,0E-08
BN5_2756	Asparagine synthetase (<i>asnB</i>)	1,146	1,197	1,963	2,4E-05	8,1E-06	2,2E-08
BN5_0180	Ammonia permease (<i>amtB</i>)	1,118	2,213	4,699	6,8 E-5	2,9 E-8	4,4E-12
BN5_2493	Bacterial regulatory protein, MarR	1,092	2,145	1,411	5,2 E-4	4,6E-07	2,8E-05
BN5_1499	Aspartate kinase	-1,078	-1,053	-2,352	2,6 E-4	2,1 E-4	3,2E-08
BN5_2445	Cytochrome <i>c</i> oxidase <i>cbb3</i> -type (<i>ccoN3</i>)	-1,111	-1,444	-1,045	2,7 E-4	1,3E-06	2,1 E-3
BN5_2705	ArsA, arsenite-activated ATPase (<i>arsA</i>)	-1,200	-2,052	-1,069	1,5E-05	1,8E-08	1,6E-05
BN5_0188	PLP-dependent decarboxylase (<i>lysA</i>)	-1,270	-1,086	-1,168	9,8E-06	3,0E-05	7,5E-06
BN5_4502	ATPase F0/VO complex, sunibut C (<i>atpE</i>)	-1,635	-1,568	-3,1809	7,5E-05	9,3E-05	2,1E-08
BN5_1328	Efflux transporter RND-HAE1 (<i>mexD</i>)	-1,730	-1,013	-2,097	1,0E-05	1,1 E-3	3,8E-07
BN5_2182	Citrate synthase I (<i>gltA</i>)	-1,774	-1,462	-3,282	1,2E-05	4,1E-05	4,3E-09
BN5_4499	ATPase, F1 complex, alpha subunit (<i>atpA</i>)	-1,807	-2,160	-3,914	1,2 E-4	1,2E-05	9,8E-09
BN5_4497	ATPase, F1 complex, beta subunit (<i>atpD</i>)	-1,831	-2,277	-4,243	5,8E-06	2,6E-07	1,7E-10
BN5_2444	Cytochrome <i>c</i> oxidase <i>cbb3</i> -type (<i>ccoP</i>)	-1,972	-3,515	-1,939	9,1E-05	1,2E-07	4,4E-05
BN5_4498	ATPase, F1 complex, gamma subunit (<i>atpG</i>)	-1,995	-2,488	-4,306	4,2E-05	2,4E-06	2,6E-09
BN5_4500	ATP synthase F1, delta subunit (<i>atpH</i>)	-2,114	-2,031	-3,572	4,1E-06	4,3E-06	3,7E-09
BN5_4309	Oxaloacetate decarboxylase (<i>oadA</i>)	-3,419	-3,827	-3,302	1,4E-11	2,8E-12	2,9E-11

^a Gen ID según el número de acceso HG916826 (Wibberg *et al.*, 2014)

Entre los genes presentados en la tabla 17, aquellos localizados en la intersección de las tres condiciones estudiadas usando amonio como control, se encontraron genes reprimidos que codifican una aspartato quinasa, subunidades de la ATPasa, citocromo *c* oxidasas, citrato sintasas y la oxalacetato decarboxilasa. Entre los genes inducidos en las tres condiciones experimentales estudiadas se identificó el gen de la nitrilasa *nitC*, que es esencial para la asimilación del cianuro en la cepa CECT5344, y otros genes de función desconocida que están presentes en la misma unidad transcripcional *nit1C*. También, se identificaron genes que codifican aminotransferasas, del tipo *GntR-MocR* y dependientes de piridoxal-fosfato, genes para la biosíntesis y transporte de biotina, genes que codifican la glutamina sintetasa, la glutamato sintasa y el transportador de amonio de alta afinidad (*AmtB*), genes para el sistema *Isc* de ensamblaje de centros Fe-S, y genes del metabolismo del cianuro, como el transportador *CynABD* de tipo ABC y la cianasa *CynS*.

Algunos genes reprimidos por el residuo de la joyería fueron el gen *aguB*, que codifica un miembro de la superfamilia nitrilasa, el gen *zur*, un regulador positivo del consumo hierro y zinc (Smith *et al.*, 2009), y el gen *dps* que codifica una ferritina de unión al DNA (Luque-Almagro *et al.*, 2015). Respecto a este último gen, se construyó una cepa mutante *Dps*⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 por inserción de un cassette de resistencia a kanamicina. El crecimiento del mutante *Dps* en presencia de altas concentraciones de CuCl_2 (2 mM), con amonio como fuente de nitrógeno, fue mucho menor que el crecimiento con la estirpe silvestre. Sin embargo, la estirpe silvestre y la mutante *Dps*⁻ mostraron similar crecimiento en presencia de FeCl_3 2 mM y amonio. En medios con cianuro, el cepa mutante *Dps*⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 mostró también un crecimiento similar a la cepa silvestre.

Con respecto a los genes afectados por cianuro, tanto NaCN como residuo cianurado se sobreexpresaron dos nitrilasas (*nit2* y *nit4*), genes del metabolismo del azufre como los que codifican una sulfito reductasa y transportadores de sulfatos y sulfonatos, el gen *cioB* que codifica una oxidasa terminal tipo *cbb3*, los genes *ccoN1* y *cyoA* de una oxidasa y varios genes del metabolismo de aminoácidos localizados en la misma agrupación génica que los genes *cioAB* y que codifican aminotransferasas para la serina, histidina y arginina. También se identificaron genes que codifican metionina sintasas dependientes o independientes de

la vitamina B12, el gen *ahpC* de una alquil hidropéroxido reductasa, el gen *fpr* de una Hmp flavohemoglobina, genes que codifican el sistema Isc para el ensamblaje de centros sulfhémicos, y el gen de la enzima málica. Entre los genes reprimidos se encontraban genes que codifican proteínas asociadas a mecanismos de resistencia frente a DNA exógeno, como el sistema CRISPR/Cas y el sistema de restricción-modificación (Luque-Almagro *et al.*, 2015).

Entre los genes inducidos tanto por residuo de la joyería como en condiciones de hambre de nitrógeno se encontraron genes relacionados con la asimilación de nitrato/nitrito, incluyendo el sistema de regulación positiva de dos componentes que responde a nitrato y/o nitrito (genes *nasT* y *nasS*), los transportadores de nitrato y nitrito, y las nitrato y nitrito reductasas. También se indujeron algunos genes reguladores de resistencia a metales, como el gen *cueR*, y otros relacionados con la síntesis de polihidroxicanoatos, transportadores de metales, como una ATPasa transportadora de Ni o Cu (gen *actP*) y una bomba de extrusión de Zn-Co-Cd, y transportadores de tipo ABC de aminoácidos, glúcidos y otros compuestos. Entre los genes reprimidos se identificó el gen *acnB*, que codifica la aconitasa B, y genes que participan en la biosíntesis del cofactor biotina en el transporte de sulfatos y en la síntesis de glutamato (*gltB1*).

4.1.6. Validación de los resultados obtenidos en los microarrays

Los datos de expresión génica obtenidos en este trabajo mediante microarrays de DNA se validaron por RT-PCR cuantitativa. Para ello se diseñaron parejas de oligonucleótidos para seis genes de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 estrechamente relacionados con el metabolismo del cianuro, como los genes *nitC* (BN5_1632) y *cioAB* (BN5_1902-BN5_1903) de asimilación y resistencia a cianuro, respectivamente, y los genes *nit3* (BN5_3251), *nit4* (BN5_3251) y *aguB* (BN5_0258), que codifican dos nitrilasas y un miembro de la superfamilia nitrilasa, respectivamente. Como se puede observar en la figura 21, el perfil de expresión de estos seis genes fue prácticamente coincidente cuando se compararon los resultados obtenidos con las dos técnicas. Sólo la nitrilasa Nit4 se indujo específicamente por cianuro (NaCN y residuo), mientras que la nitrilasa Nit3 no se afectó en ninguna de las tres condiciones analizadas frente a amonio. La nitrilasa NitC que es esencial para la asimilación de cianuro (Estepa *et al.*, 2012) se indujo en las tres condiciones, si bien su

inducción fue mayor en presencia de cianuro. La expresión del gen *aguB*, al igual que en el gen *nit3*, tampoco se vió afectada en las condiciones de estudio. Los genes *cioAB* de resistencia a cianuro se indujeron específicamente por cianuro, tanto por el NaCN como por el residuo cianurado.

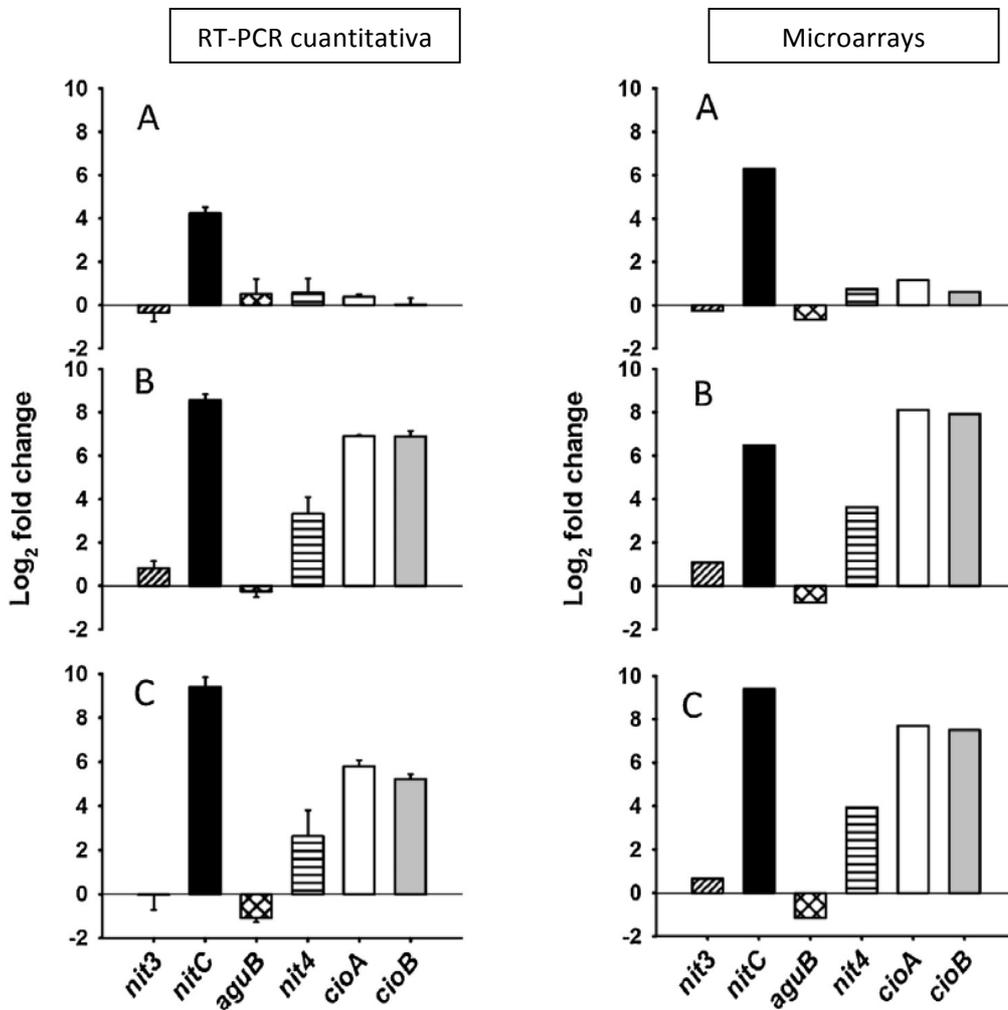


Figura 21: Validación de los datos de microarrays mediante RT-PCR cuantitativa. La expresión génica de los seis genes analizados se estudió en células cultivadas en condiciones de hambre de nitrógeno (A), en células cultivadas con NaCN (B), y en células cultivadas con el residuo cianurado de la joyería (C). Como control se utilizó la expresión de estos genes en células cultivadas con amonio. Los datos de RT-PCR cuantitativa representan una media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

4.2. Análisis proteómico y mutacional de la respuesta a limitación de hierro y a cianuro en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

Para estudiar la respuesta global de la bacteria cianotrofa *P. pseudoalcaligenes* al cianuro se ha realizado una aproximación proteómica en este trabajo.

4.2.1. Análisis proteómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en condiciones de limitación de hierro causadas por quelantes

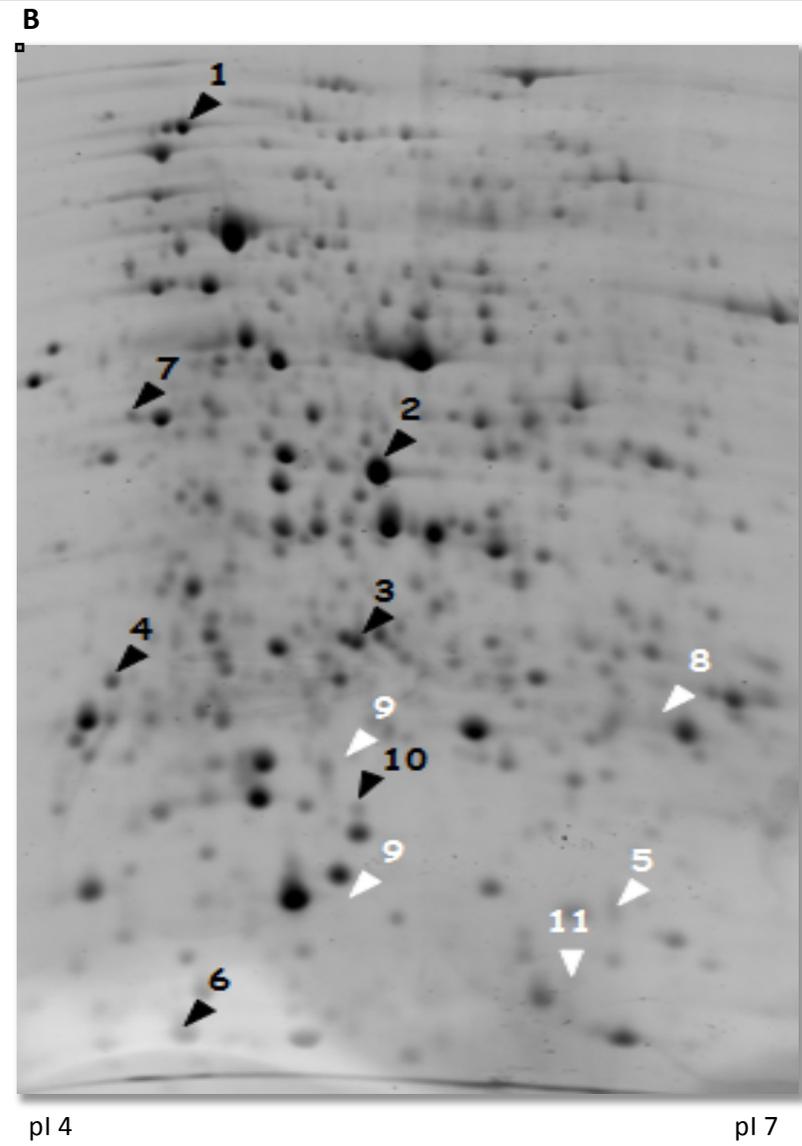
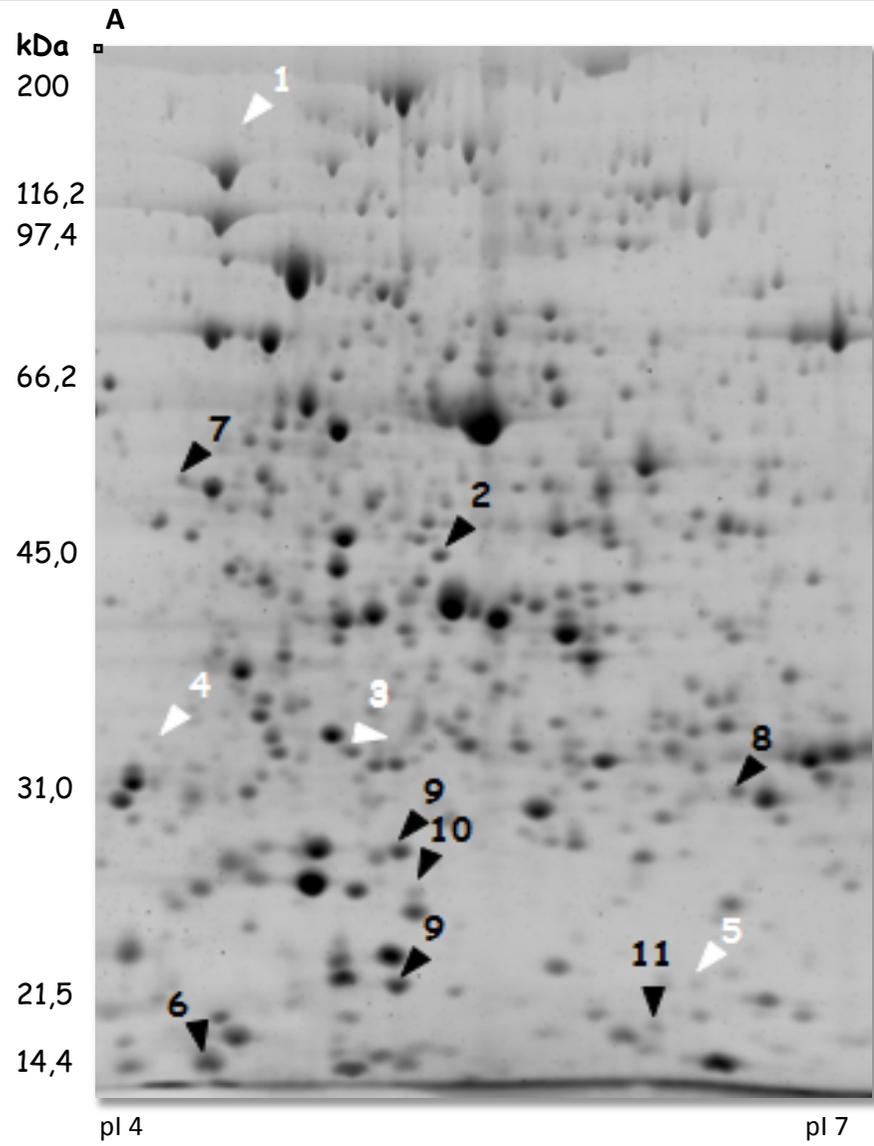
Un quelante es una sustancia que forma complejos con iones metálicos. Una de las aplicaciones de los quelantes es evitar la toxicidad para los seres vivos de los metales pesados, ya que estos se combinan con uno o más grupos reactivos esenciales para las funciones fisiológicas normales. Los quelantes compiten con los metales por los grupos reactivos fisiológicos, evitando o revirtiendo así sus efectos tóxicos. Existen agentes secuestradores como los polifosfatos que se usan como aditivos alimentarios, el ácido etilendiaminotetraacético o EDTA, el ácido glucónico, el ácido cítrico, el ácido tartárico, la piridina, el oxalato y la lignina (Dean *et al.*, 2011). Entre los quelantes de hierro destacan la desferrioxamina, que es un sideróforo que se obtiene de *Streptomyces pilosus*, la desferriprona, que es una hidroxipiridina que se obtiene por síntesis química, el ácido aminopolicarboxílico sintético, la dietilentriamina pentaacético o DTPA y la pioverdina, que es un sideróforo producido por *Pseudomonas fluorescens*. De estos quelantes, son muy utilizados la desferrioxamina en biomedicina y el EDTA en la alimentación, la agricultura y la cosmética (Heras, 1995).

La formación de complejos extremadamente estables entre el cianuro y el hierro (Tabla 2) limita en gran medida la biodisponibilidad de este metal. Por lo tanto, una hipótesis ha sido que aquellos microorganismos capaces de crecer en presencia de cianuro deben desarrollar sistemas de captación con una elevada afinidad por el hierro (Andrews *et al.*, 2003; Huertas *et al.*, 2006). Con el fin de estudiar la posible relación entre el cianuro y la limitación de hierro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, esta estirpe se cultivó en medio mínimo M9 con acetato 50 mM como fuente de carbono y NH_4Cl 10 mM como fuente de nitrógeno, y se añadieron al medio trazas con hierro, trazas sin hierro, desferrioxamina 50 μM o EDTA 250 μM . Las células se recogieron en mitad de la fase exponencial ($A_{600} \sim 0,7$),

y posteriormente se obtuvieron los extractos acelulares por sonicación. Después de una centrifugación, los sobrenadantes correspondientes a las fracciones solubles (periplasma y citoplasma) se sometieron a electroforesis bidimensional (2D-PAGE). Las manchas de interés se identificaron mediante MALDI-TOF/TOF (Fig. 22, Tabla 18).

En la tabla 19 se muestran proteínas afectadas por limitación de hierro en comparación con el análisis transcriptómico en respuesta a cianuro (NaCN o residuo joyero) y a ausencia de nitrógeno. Se presentan los valores del número de veces que cambia la expresión de los genes respecto a amonio como control. El valor p fue inferior a 0,05.

En la tabla 20 se muestra la inducción o represión de las proteínas afectadas por la disponibilidad de hierro. Se observa que las proteínas isocitrato liasa (BN5_1853) y la proteína de membrana externa OmpW (BN5_3662) están reprimidos cuando hay limitación de hierro en el medio.



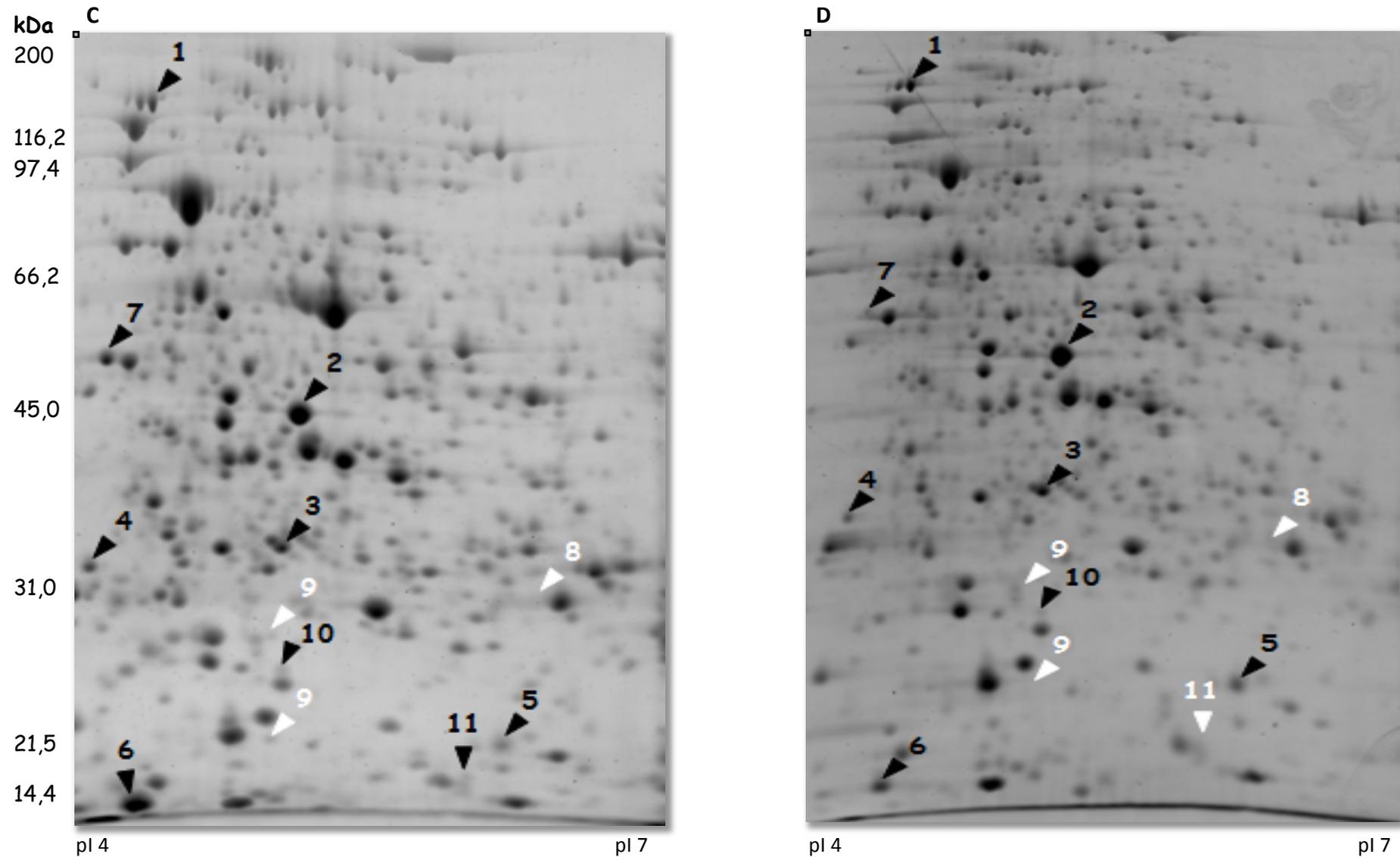


Figura 22: Análisis proteómico de *P. pseudoalcaligenes* con alta o baja concentración de hierro. *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se cultivó en medio mínimo M9 con trazas con hierro (A), trazas sin hierro (B), desferrioxamina 50 μM (C) o EDTA 250 μM (D). Los triángulos negros señalan la presencia de proteínas y los triángulos blancos la ausencia de las mismas. Los gels mostrados corresponden a un gel representativo de tres gels realizados para cada una de las cuatro condiciones.

Tabla 18: Identificación de las manchas del análisis proteómico de *P. pseudoalcaligenes* en respuesta a limitación de hierro.

pot	Protein Score	Protein Score CI%	Nombre de la proteína	MW (Da)	PI	CDS GenBank	Nº péptidos identificados	Total Ion Score	Total Ion C. I. %	Gen (*)
1	83	99,982	Recetor de sideróforos dependiente de TonB (FhuA)	83 029,3	5,11	CDM39303	6	65	99,999	BN5_0694
2	878	100	Componente periplásmico de un transportador de hierro tipo ABC	36 603,7	5,53	CDM38862	17	719	100	BN5_0248
3	838	100	3-oxoácido CoA-transferasa	25 227	5,13	CDM41862	12	718	100	BN5_3307
4	762	100	Transductor de energía (TonB)	28 740,7	4,84	CDM42213	23	499	100	BN5_3661
5	407	100	Alquilhidroperoxidasa (AhpD)	19 727,1	5,24	CDM42986	7	330	100	BN5_4452
6	261	100	Azurina	15 706,8	5,2	CDM39158	5	222	100	BN5_0546
7	717	100	Proteína extracelular de unión a soluto	37 636,8	4,84	CDM42304	12	623	100	BN5_3761
8	201	100	Isocitrato liasa	59 425,7	5,52	CDM40429	13	117	100	BN5_1853
9	224	100	Proteína de membrana externa OmpW	24 485,5	5,63	CDM42214	6	181	100	BN5_3662
10	111	100	Proteína de la familia YceI	20 335,4	5,7	CDM38935	4	88	100	BN5_0321
11	170	100	Proteína de unión a cobre (tipo 1)	19 020,4	6,04	CDM40651	6	129	100	BN5_2079

* Código de acceso para la identificación de los genes: HG916826 (Wibberg *et al.*, 2014).

Tabla 19: Análisis comparativo entre los resultados proteómicos obtenidos en limitación de hierro y los transcriptómicos en respuesta a cianuro de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

Spot	Nombre de la proteína	Gen (*)	CDM GenBank	Log ₂ FC		
				NaCN	Residuo	-N
1	Recetor de sideróforos dependiente de TonB (FhuA)	BN5_0694	CDM39303	-	2,77	1,22
2	Componente periplásmico de un transportador de hierro tipo ABC	BN5_0248	CDM38862	-	1,59	-
3	3-oxoácido CoA-transferasa	BN5_3307	CDM41862	5,37	-	-
4	Transductor de energía (TonB)	BN5_3661	CDM42213	-	1,33	-
5	Alquilhidroperoxidasa (AhpD)	BN5_4452	CDM42986	-	-1,45	-2,13
6	Azurina	BN5_0546	CDM39158	1,14	-	1,55
7	Proteína extracelular de unión a soluto	BN5_3761	CDM42304	-1,12	-	2,38
8	Isocitrato liasa	BN5_1853	CDM40429	-	-3	-1,08
9	Proteína de membrana externa OmpW	BN5_3662	CDM42214	-	-1,84	-
10	Proteína de la familia YceI	BN5_0321	CDM38935	-	1,74	-
11	Proteína de unión a cobre (tipo 1)	BN5_2079	CDM40651	-	2,84	2,16

* Código de acceso para la identificación de los genes: HG916826 (Wibberg *et al.*, 2014).

Tabla 20: Análisis comparativo proteómico de las proteínas afectadas por la disponibilidad de hierro. De, deferrioxamina.

Spot	Nombre de la proteína	Gen (*)	+Fe	-Fe	+De (**)	+EDTA
1	Recetor de sideróforos dependiente de TonB (FhuA)	BN5_0694	-	+	++	+
2	Componente periplásmico de un transportador de hierro tipo ABC	BN5_0248	+	++	+++	+++
3	3-oxoácido CoA-transferasa	BN5_3307	-	+	+	+
4	Transductor de energía (TonB)	BN5_3661	-	++	++	+
5	Alquilhidroperoxidasa (AhpD)	BN5_4452	-	-	+	++
6	Azurina	BN5_0546	++	+	+++	++
7	Proteína extracelular de unión a soluto	BN5_3761	+	++	+	+
8	Isocitrato liasa	BN5_1853	+	-	-	-
9	Proteína de membrana externa OmpW	BN5_3662	+	-	-	-
10	Proteína de la familia YceI	BN5_0321	++	++	+	+
11	Proteína de unión a cobre (tipo 1)	BN5_2079	+	+	-	-

* Código de acceso para la identificación de los genes: HG916826 (Wibberg *et al.*, 2014).

** Deferrioxamina

Para comprobar si el cianuro provoca una respuesta de limitación de hierro a corto plazo en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, se realizó un análisis proteómico de la estirpe CECT5344 en presencia de cianuro. Mediante 2D-PAGE se buscaron las proteínas FhuA y el componente periplásmico del transportador CDM38862 de tipo ABC (BN5_0248) como indicadores de la posible deficiencia de hierro generada por cianuro. *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se precultivó en medio mínimo M9 con NH_4Cl 2 mM (dos matraces de 2 litros). A las 24 horas, cuando se había consumido todo el NH_4^+ , se añadió 2 mM de NaCN y a los 45 minutos se recogió uno de los matraces y a las 1,5 horas el otro. (Fig. 23).

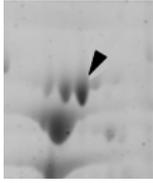
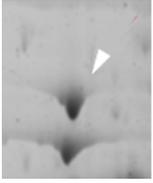
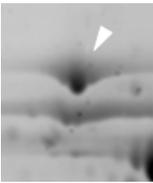
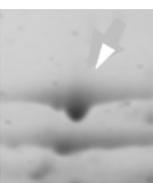
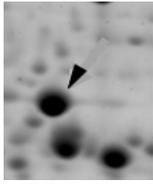
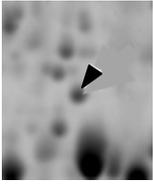
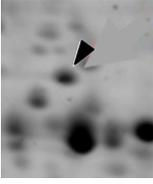
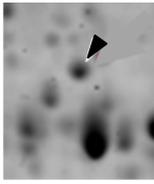
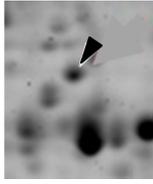
Proteína/ Gen	+deferoxamina	-deferoxamina	-NaCN	+NaCN 45 min	+NaCN 1,5 horas
FhuA (BN5_0694)					
Componente periplásmico del transportador tipo ABC (BN5_0248)					

Figura 23: Respuesta a cianuro de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 a tiempos cortos. Los triángulos negros señalan la presencia de proteínas y los triángulos blancos la ausencia de las mismas.

Como se puede observar en la figura 23 FhuA sólo se indujo en presencia del quelante desferrioxamina y no con cianuro. Sin embargo, el componente periplásmico del transportador tipo ABC (BN5_0248) se indujo en todas las condiciones, pero mucho más con el quelante desferrioxamina.

4.2.2. Mutagénesis en el gen *fhuA* y caracterización de la estirpe mutante

En bacterias, la homeostasis de hierro se logra en gran medida gracias al factor transcripcional Fur (Crosa, 1997; Andrews *et al.*, 2003). Fur fue inicialmente identificado en *E. coli* (Hantke, 1990), aunque este factor transcripcional ha sido caracterizado en una gran cantidad de bacterias Gram negativas (Bereswill *et al.*, 2000) y Gram positivas (Heidrich *et al.*, 1996). Mediante predicciones bioinformáticas se ha definido la secuencia consenso de la caja Fur para la proteína Fur (Quatrini *et al.*, 2007).

Con el fin de conocer el papel del gen *fhuA* en la homeostasis de hierro de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, se construyó un mutante deficiente en ese gen mediante delección parcial e inserción de un cassette de resistencia a kanamicina (Fig. 24).



Figura 24: Entorno génico del gen *fhuA*. *fhuE* (BN5_0698), receptor dependiente de TonB; *glcD* (BN5_0692), glicolato oxidasa dependiente de FMN; *orf1* (BN5_0693), *fhuA* (BN5_0694), receptor de sideróforos tipo ferricromo dependiente de TonB; *speC* (BN5_0695), ornitina descarboxilasa; *cysJ* (BN5_0696), componente de membrana regulado por hierro; *prfC* (BN5_0697), péptido del factor 3.

Mediante PCR se amplificó un fragmento de 3 257 pb que comprendía el gen *fhuA*, usando como cebadores los oligonucleótidos *fhuAExtF* y *fhuAExtR* (Tabla 11) y DNA genómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 como molde. El producto resultante se clonó en el vector pGEM-T Easy, obteniéndose el plásmido pGEMT-*fhuA* (Fig. 25). El gen *fhuA* fue mutado por delección parcial e inserción del cassette de resistencia a kanamicina en los sitios de restricción *BbrPI* y *EcoRV*. Este plásmido se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* y se obtuvo un fragmento de 3 189 pb que contenía al gen *fhuA* mutado. Dicho fragmento se clonó en el vector pK18mob δ E, que presenta un marcador de resistencia a kanamicina, obteniéndose el plásmido pK18mob δ E-*fhuA*, el cual se transfirió mediante conjugación desde la estirpe donadora *E. coli* S17-1 a la estirpe receptora *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (resistente a ácido nalidíxico), obteniéndose mediante recombinación homóloga el mutante deficiente en el gen *fhuA*. Los transconjugantes se sembraron en medio rico LB con kanamicina y ácido nalidíxico. Para comprobar la mutación se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos *fhuAExtF* y *fhuAExtR* (Tabla 11) y DNA genómico de las colonias transconjugantes como DNA molde. El tamaño del fragmento de PCR obtenido fue de 3 189 pb, lo que confirmó la mutación en el gen *fhuA*.

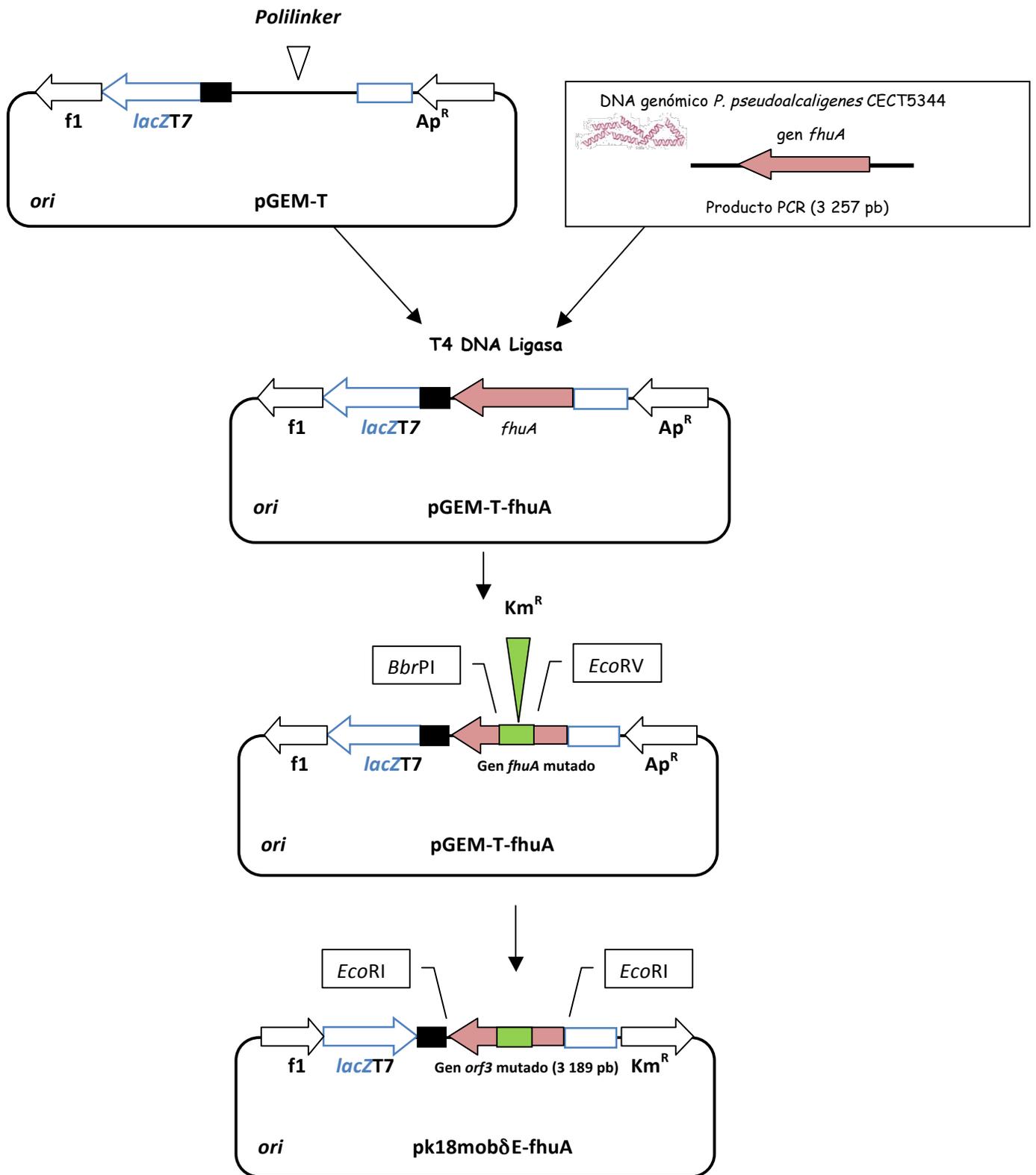


Figura 25: Construcción del mutante en el gen *fhuA*. Las abreviaturas utilizadas son: T7, promotor de la RNA polimerasa del fago T7; *lacZ*, gen de la β-galactosidasa; *f1*, región del fago 1 y *ori*, origen de replicación del plásmido; *Ap^R*, cassette de resistencia a ampicilina; *Km^R*, cassette de resistencia a kanamicina.

Para conocer la función del gen *fhuA* en la homeostasis de hierro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5433, se precultivaron las cepas silvestre y mutante *fhuA* en medio mínimo M9 con 10 mM de NH_4Cl , en presencia o ausencia del quelante de hierro desferrioxamina (Fig. 26).

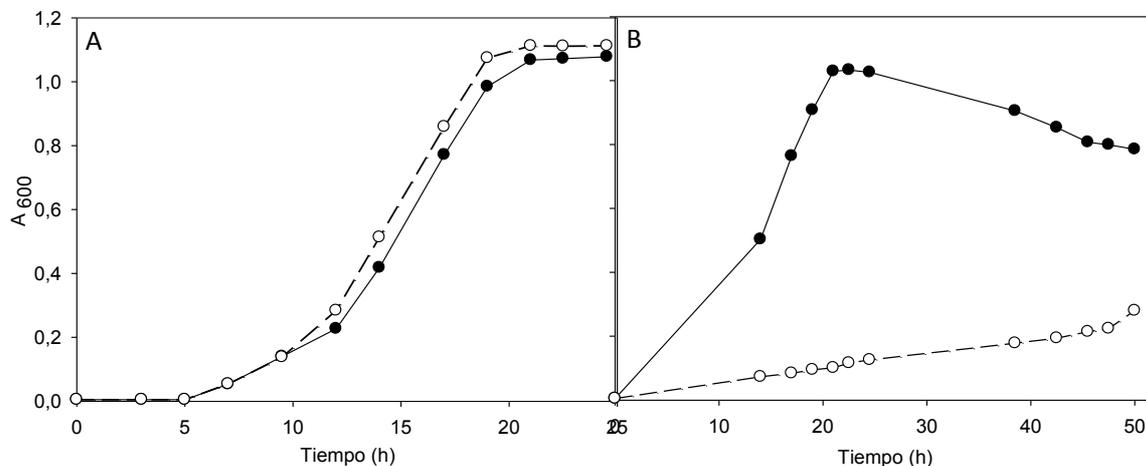


Figura 26: Efecto del quelante desferrioxamina en el mutante *fhuA*⁻. Las estirpes de *P. pseudoalcaligenes* silvestre (●) y mutante *fhuA*⁻ (○) se cultivaron en medio mínimo M9 con NH_4Cl 10 mM como fuente de nitrógeno, en ausencia (A) o presencia (B) de desferrioxamina 50 μM . Las gráficas mostradas corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Al cultivar las estirpes silvestre y mutante *fhuA*⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con desferrioxamina se observó la dificultad que presenta el mutante para crecer en medios con poca disponibilidad de hierro.

Con el fin de conocer la posible función del gen *fhuA* en la asimilación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5433, se precultivaron las cepas silvestre y mutante *fhuA*⁻ en medio mínimo M9 con acetato 50 mM y NH_4Cl 2 mM como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. A las 24 horas, cuando todo el amonio se había consumido, las células se centrifugaron y resuspendieron en medio mínimo M9 con diferentes concentraciones de hierro y fuentes de nitrógeno (Fig. 27). La concentración de hierro estándar usada fue 25 μM , y para condiciones de exceso de hierro se utilizó una concentración de hierro 150 μM . También se utilizó el residuo joyero, que entre otros metales contiene hierro a altas concentraciones, en el rango mM, por lo que en ese caso no se añadió hierro.

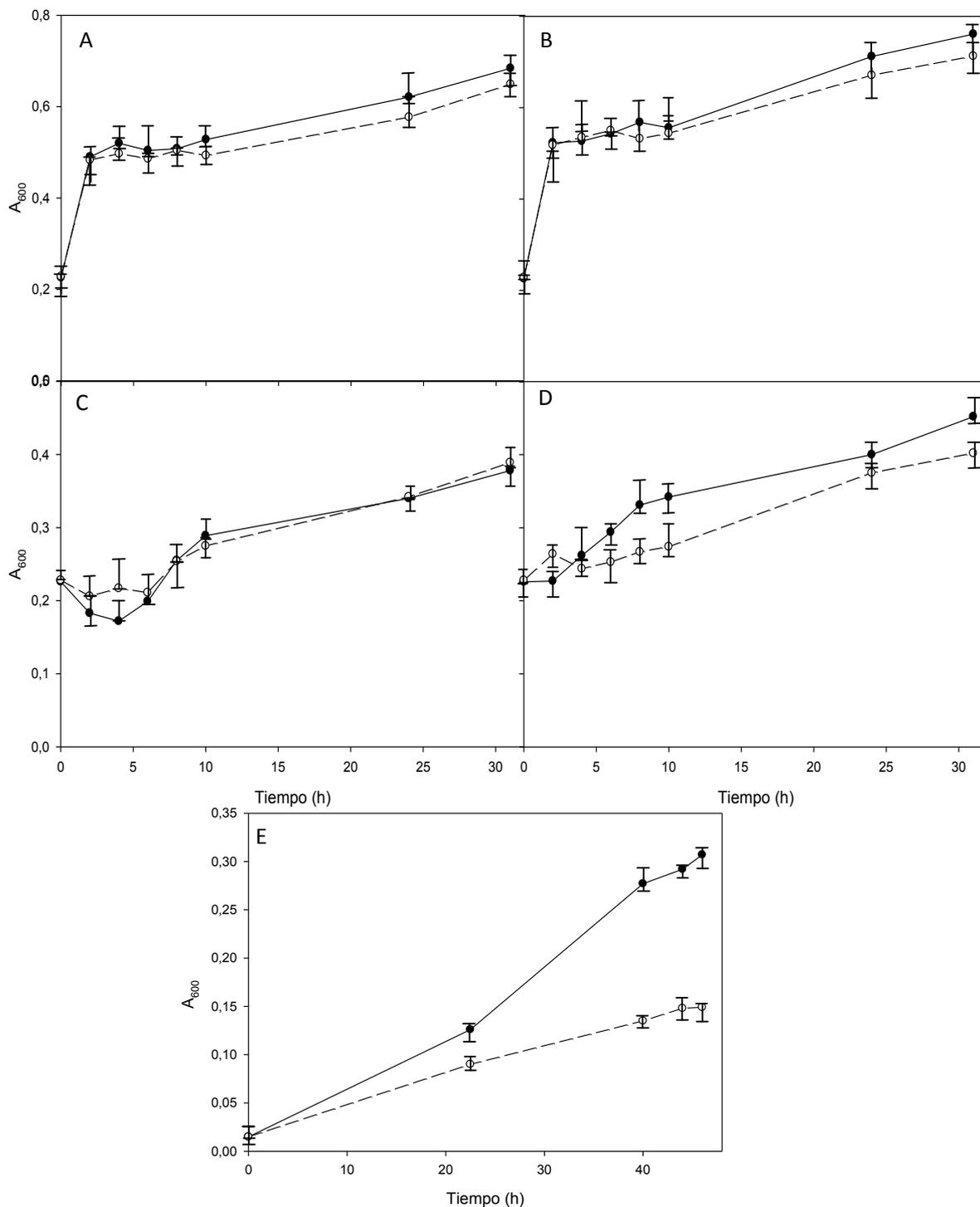


Figura 27: Efecto del hierro y el cianuro en el mutante *fhuA*⁻. Las estirpes *P. pseudoalcaligenes* silvestre (●) y mutante *fhuA*⁻ (○) se cultivaron con NH_4Cl 2 mM y 25 μM de hierro (A), NH_4Cl 2 mM y 150 μM de hierro (B), NaCN 2 mM y 25 μM de hierro (C), NaCN 2 mM y 150 μM de hierro (D) y con residuo joyero (CN⁻ 2 mM) (E). La estirpe silvestre se representa con línea continúa y la mutante con línea discontinua.

Tanto la estirpe silvestre como el mutante *fhuA*⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 mostraron un crecimiento similar en presencia de bajas concentraciones de hierro, en medios con amonio o cianuro como fuente de nitrógeno. Sin embargo, en medios con alta concentración de hierro, y en especial en el medio con residuo joyero, la estirpe mutante *fhuA*⁻ creció menos que la cepa silvestre.

4.2.3. Mutagénesis en el gen BN5_0248 (*orf3*)

Con el fin de conocer el papel del gen BN5_0248 (*orf3*) en la homeostasis de hierro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, se construyó un mutante deficiente en ese gen mediante inserción de un cassette de resistencia a kanamicina (Figs. 28 y 29).



Figura 28: Entorno génico de *orf3*. *ubiH* (BN5_0246), hidrolasa para la síntesis de ubiquinona; *ubiF* (BN5_0247), oxigenasa de la ubiquinona; (BN5_0248), componente de unión de un transportador de hierro tipo ABC; (BN5_0249), permeasa de un sistema de transporte férrico; *gcvT* (BN5_0250) y *gcvH* (BN5_0251), sistema de exsición de la glicina; *arsR* (BN5_0248), regulador transcripcional de la familia ArsR.

Mediante PCR se amplificó un fragmento de 1 476 pb que comprendía el gen BN5_0248 (*orf3*) usando como cebadores los oligonucleótidos *orf3F* y *orf3R* (Tabla 11) y DNA genómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 como molde. El producto resultante se clonó en el vector pGEM-T Easy, obteniéndose el plásmido pGEMT-*orf3*. El gen *orf3* fue mutado por inserción del cassette de kanamicina en el sitio de restricción *SfoI* (Fig. 29). Este plásmido se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* y se obtuvo un fragmento de 2 965 pb que contenía al gen *orf3* mutado. Dicho fragmento se clonó en el vector pK18mobδE, que presenta un marcador de resistencia a kanamicina, obteniéndose el plásmido pK18mobδE-*orf3*, el cual se transfirió mediante conjugación desde la estirpe donadora *E. coli* S17-1 a la estirpe receptora CECT5344 de *P. pseudoalcaligenes* (ácido nalidíxico resistente), obteniéndose mediante recombinación homóloga el mutante deficiente en el gen *orf3*. Los transconjugantes se sembraron en medio rico LB con kanamicina y ácido nalidíxico. Para comprobar la incorporación de la mutación se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos *orf3F* y *orf3R* (Tabla 11) y DNA genómico de las colonias transconjugantes como DNA molde.

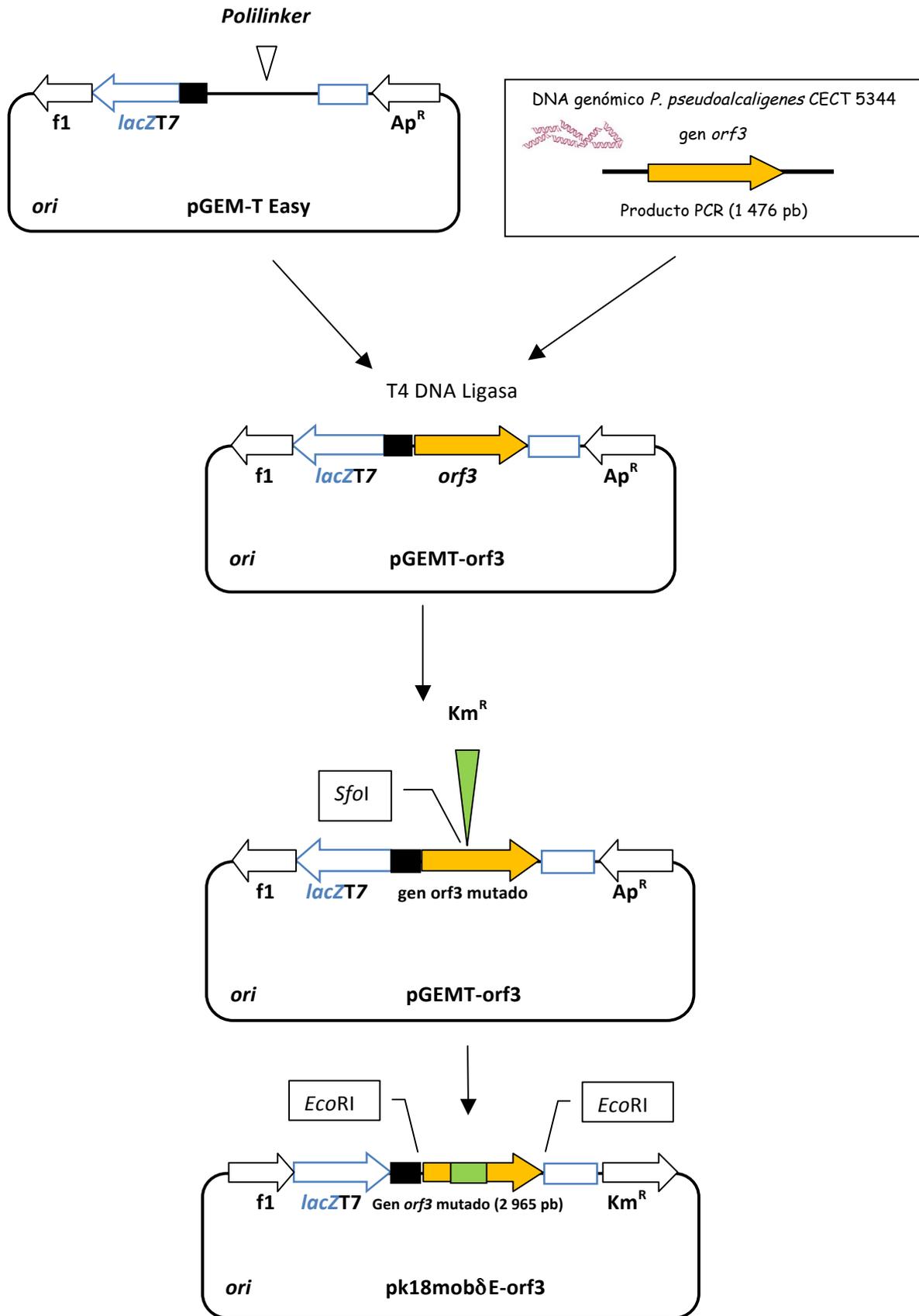


Figura 29: Construcción del mutante en el gen *orf3*. Las abreviaturas utilizadas son: T7, promotor de la RNA polimerasa del fago T7; *lacZ*, gen de la β-galactosidasa; *f1*, región del fago 1 y *ori*, origen de replicación del plásmido; *Ap^R*, cassette de resistencia a ampicilina; *Km^R*, cassette de resistencia a kanamicina.

Todas las colonias transconjugantes resistentes a kanamicina y ácido nalidíxico fueron analizadas mediante PCR, encontrando tan sólo recombinantes simples. Se analizaron cientos de colonias obtenidas en diferentes procesos de conjugación, aunque fue imposible obtener un recombinante doble.

4.2.4. Determinación de hierro intracelular en la estirpe silvestre *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

La regulación del hierro intracelular es fundamental para el crecimiento y supervivencia de las bacterias. Para estudiar el efecto del cianuro sobre la cantidad de hierro intracelular, se precultivó la estirpe silvestre *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en medio mínimo M9 con NH_4Cl 2 mM. A las 24 horas, cuando ya se había consumido todo el amonio, se añadió NH_4Cl , KNO_3 o NaCN 2 mM y se determinó la concentración de hierro intracelular (Fig. 30).

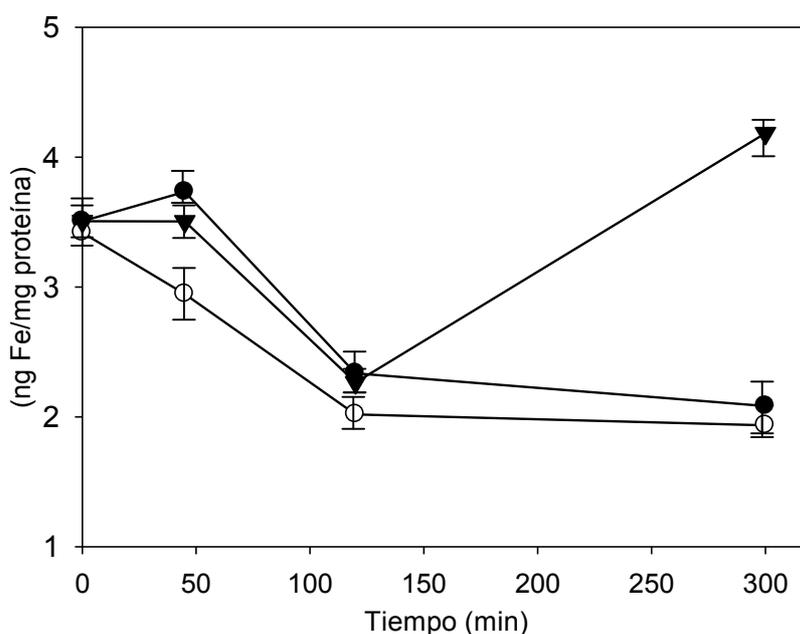


Figura 30: Efecto del cianuro en el contenido intracelular de hierro. Las células de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se cultivaron con NH_4Cl 2 mM (●), KNO_3 2mM (○) o NaCN 2mM (▼) como fuente de nitrógeno.

Hasta las 2 horas de crecimiento, la concentración de hierro intracelular fue similar en todos los medios, independientemente de la fuente de nitrógeno añadida, pero tras 5 horas de cultivo las células crecidas con cianuro mostraron un contenido de hierro muy superior al de las células crecidas con amonio o nitrato.

4.2.5. Análisis proteómico mediante 2D-PAGE de la respuesta global a cianuro en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

Para caracterizar la respuesta a cianuro de la estirpe CECT5344 se ha procedido a realizar un análisis proteómico mediante la técnica 2D-PAGE. Para generar la inducción de una respuesta a largo plazo, las células de *P. pseudoalcaligenes* se han cultivado en presencia de cianuro sódico durante aproximadamente 10 horas.

Para realizar este análisis proteómico *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se precultivó en medio mínimo M9 con NH_4Cl 2 mM en dos matraces. A las 24 horas, cuando se había consumido todo el amonio, se añadió a uno de los matraces KNO_3 y NaCN al otro, ambas fuentes de nitrógeno a una concentración final de 2 mM. Las células se recogieron en la fase exponencial de crecimiento ($A_{600} \sim 0,5$). Posteriormente, se obtuvieron los extractos acelulares (como se indica en Materiales y Métodos) y la fracción soluble se sometió a electroforesis bidimensional (2D-PAGE). Las manchas de interés se identificaron mediante MALDI-TOF/TOF (Fig. 31, Tabla 21).

En la tabla 22 se presenta una comparativa de estos resultados con el análisis transcriptómico de los genes que codifican estas proteínas. Los spots 1,2, 4 y 5 son proteínas que no se indujeron en NO_3^- pero sí en CN^- . El spot 3 (NitB) se induce por CN^- pero se detecta algo en NO_3^- . Este spot presenta diferentes fases modificadas, con distinta masa molecular y punto isoeléctrico. Las proteínas NitB, NitC y NitG están codificadas por la agrupación nit1C que se ha visto que es esencial para la asimilación del cianuro (Estepa *et al.*, 2012) y los genes *ahpC* y *dapA* se estudiarán mediante mutagénesis en el apartado 4.2.8.

En la tabla 22 también se presentan los valores del número de veces que cambia la expresión de los genes en los medios indicados respecto a amonio como control. El valor p de estos resultados fue inferior a 0,05.

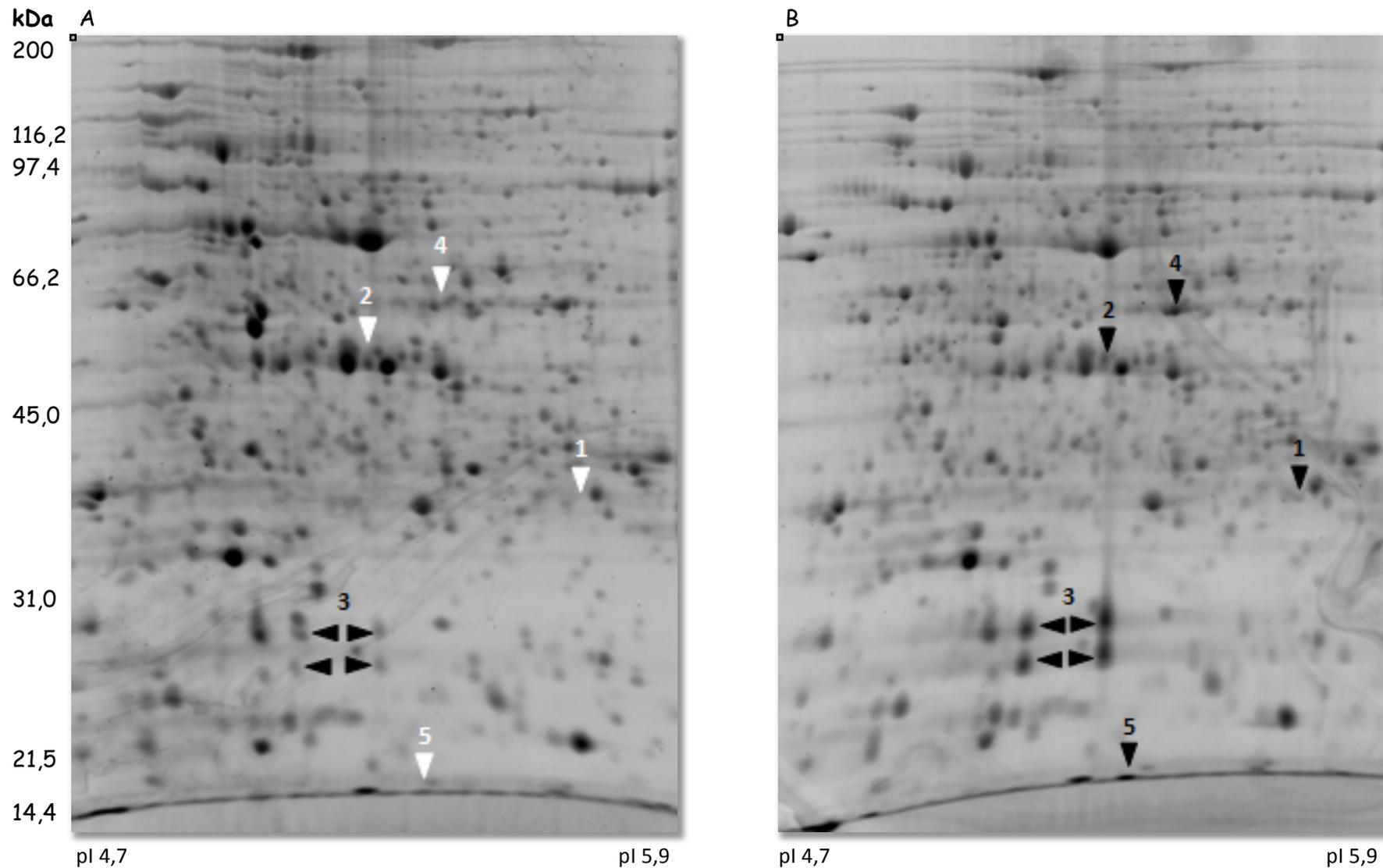


Figura 31: Análisis proteómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con KNO_3 2 mM (A) o NaCN 2 mM (B) como fuente de nitrógeno. Los triángulos negros indican la presencia de la proteína y los triángulos blancos la ausencia de ella. Los gels mostrados corresponden a un gel representativo de tres gels realizados para cada condición.

Tabla 21: Identificación de las manchas del análisis 2D-PAGE de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 inducidas por cianuro

Spot	Protein Score	Protein Score CI%	Nombre de la proteína	NW	PI	Nº acceso	Péptidos	Total Ion Score	Total Ion C. I. %	Gen (*)
1	187	100	Subunidad C de la alquil hidropéroxido reductasa (AhpC)	93023,1	5,87	CDM41595	8	71	100	BN5_3036
2	320	100	Dihidrodipicolinato sintasa (DapA)	33727	5,36	CDM40481	11	654	100	BN5_1907
3	160	100	Proteína de función desconocida (NitB)	17783	5,42 5,20	CDM40222	21	723	100	BN5_1631
4	326	100	Nitrilasa (NitC)	35825	5,57	CDM40223	15	543	100	BN5_1632
5	105	100	Proteína de función desconocida (NitG)	11557	5,46	CDM40227	32	438	100	BN5_1636

* Número de acceso para la identificación de los genes: HG916826 (Wibberg *et al.*, 2014).

Tabla 22: Análisis comparativo transcriptómico y proteómico de componentes inducidos por cianuro.

Spot	Nombre de la proteína	Gen (*)	KNO ₃	NaCN	CDM GenBank	Log ₂ FC		
						NaCN	Residuo	-N
1	Subunidad C de la alquil hidropéroxido reductasa (AhpC)	BN5_3036	-	+	CDM41595	-	-	-1,66
2	Dihidrodipicolinato sintasa (DapA)	BN5_1907	-	+	CDM40481	6,38	6,03	-
4	Proteína de función desconocida (NitB)	BN5_1631	+	+++	CDM40222	7,68	9,28	6,72
5	Nitrilasa (NitC)	BN5_1632	-	+	CDM40223	6,48	9,3	6,29
6	Proteína de función desconocida (NitG)	BN5_1636	-	+	CDM40227	8,63	10,05	7,85

* Código de acceso para la identificación de los genes: HG916826 (Wibberg *et al.*, 2014).

Además de usar KNO_3 como fuente de nitrógeno alternativa a NaCN , también se utilizó NH_4Cl y se realizó un estudio proteómico similar al anterior para identificar las manchas inducidas por cianuro. Además de encontrar inducidas por cianuro las manchas descritas en la tabla 21, se encontró un spot inducido en presencia de cianuro que no apareció en amonio (Fig. 32). Este spot se ha sido identificado como el componente periplásmico de un transportador de ácidos dicarboxílicos ya que presentó una gran similitud con la subunidad DctP de un transportador TRAP (Tripartite ATP-independent Periplasmic Transporter) de ácidos carboxílicos tipo C4 de *Pseudomonas mendocina*.

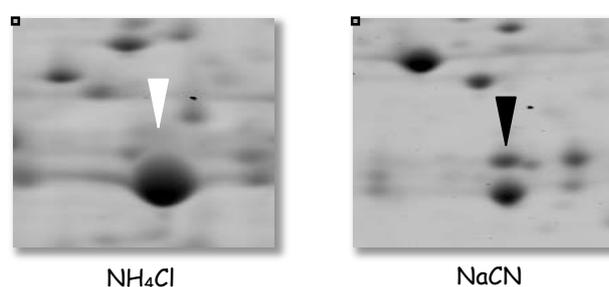


Figura 32: Componente periplásmico de un transportador de ácidos dicarboxílicos DctP1 inducido por cianuro en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 (BN5_4141, 135,5 kDa, pI 11,15). El triángulo negro indica la presencia de la proteína y el triángulo blanco la ausencia de la misma. La proteína DctP1 tiene un punto isoeléctrico de 11,15 y una masa molecular de 135,5 kDa.

4.2.6. Mutagénesis del gen *dctP1* y caracterización de la estirpe mutante

En el borrador de la secuencia completa del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Luque-Almagro *et al.*, 2013) se identificó el gen *dctP1* (BN5_4141) que codifica este componente periplásmico de tipo DctP, que se encuentra en una agrupación génica formada por otros cuatro genes (Fig. 33). El sistema transportador TRAP está codificado en el operón *dctPQM*, que codifica la proteína DctP de unión al sustrato, localizada en el periplasma, la proteína DctQ integral de membrana, más pequeña con cuatro dominios transmembrana, y la proteína DctM integral de membrana de gran tamaño y con 12 dominios transmembrana. Los genes *dctB1* y *dctD1* localizados en la misma agrupación génica codifican proteínas citosólicas reguladoras (Fig. 33). La unión del sustrato a DctP1 provoca la fosforilación de un residuo de histidina en el componente DctB1 y este grupo fosfato es transferido a un residuo aspartato del regulador citoplasmático DctD1 (Forward *et al.*, 1997).



Figura 33: Entorno génico del gen *dctP1*. *dctB1* (BN5_4139) y *dctD1* (BN5_4140) codifican proteínas reguladoras; *dctP1* (BN5_4141) codifica una pequeña proteína de unión al sustrato en el periplasma; *dctQ1* (BN5_4142) codifica una proteína integral de membrana; *dctM1* (BN5_4143) codifica una proteína integral de membrana de gran tamaño.

Con el fin de conocer el papel del gen *dctP1* (BN5_4141) en la asimilación de cianuro por *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, se construyó un mutante de esta cepa para ese gen mediante la inserción del cassette de resistencia a gentamicina. Para ello, mediante PCR se amplificó un fragmento de 1 500 pb que comprendía el gen *dctP1*, usando como cebadores los oligonucleótidos *dctP1F* y *dctP1R* (Tabla 11) y DNA genómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 como molde. El producto resultante se clonó en el vector de clonación pGEM-T Easy, obteniéndose el plásmido pGEMT-*dctP1* (Fig. 34). El gen *dctP1* fue mutado por inserción del cassette de gentamicina en el sitio de restricción *PstI*, situado en una región interna de dicho gen. Este plásmido se digirió con las enzimas de restricción *SpeI* y *SphI*, y se obtuvo un fragmento de 2 438 pb que contenía al gen *dctP1* mutado. Dicho fragmento se clonó como un fragmento *BamHI/HindIII* en el vector pK18mob δ E, que presenta un marcador de resistencia a kanamicina, obteniéndose el plásmido pK18mob δ E-*dctP1*, el cual se transfirió mediante conjugación desde la estirpe donadora *E. coli* S17-1 a la estirpe silvestre receptora CECT5344 de *P. pseudoalcaligenes*, obteniéndose mediante recombinación homóloga el mutante *dctP1*. Los transconjugantes se seleccionaron por resistencia a gentamicina y ácido nalidíxico y sensibilidad a kanamicina. Para comprobar la mutación se llevaron a cabo reacciones de PCR, utilizando los oligonucleótidos *dctP1F* y *dctP1R* (Tabla 11). El tamaño del fragmento de PCR obtenido fue 2 438 pb, lo que confirmó la presencia de la mutación (Fig. 34).

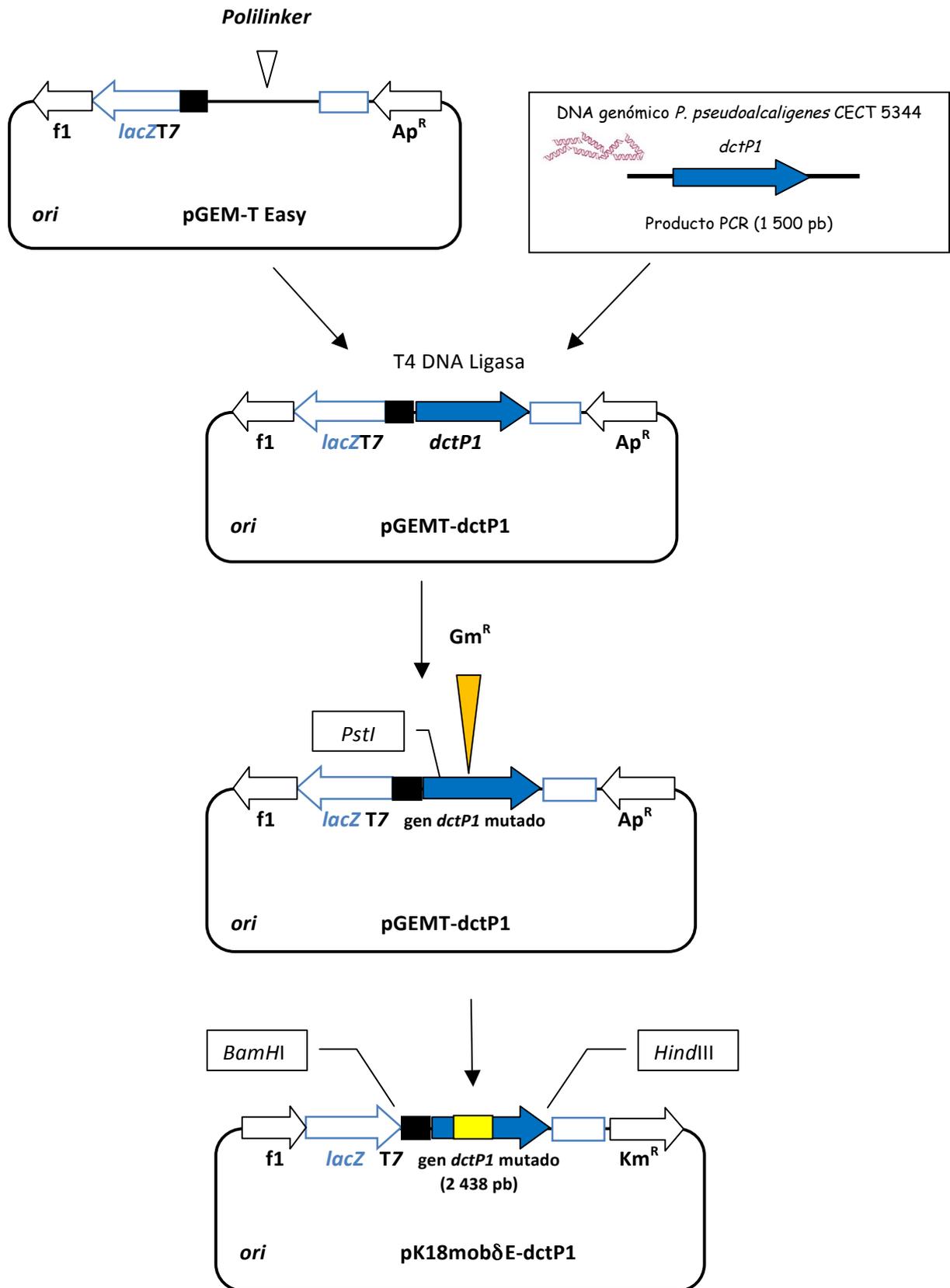


Figura 34: Construcción del mutante en el gen *dctP1*. Las abreviaturas utilizadas son: T7, promotor de la RNA polimerasa del fago T7; *lacZ*, gen que codifica la β-galactosidasa; *f1*, región del fago 1 y *ori*, origen de replicación del plásmido; *Ap^R*, cassette de resistencia a ampicilina; *Gm^R*, cassette de resistencia a gentamicina; *Km^R*, cassette de resistencia a kanamicina.

Las estirpes mutante *dctP1* y silvestre de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se cultivaron con la fuente de carbono rutinaria, acetato 50 mM, y diferentes concentraciones de NH_4Cl (2 ó 10 mM), observándose que ambas estirpes crecieron de forma similar (Fig. 35).

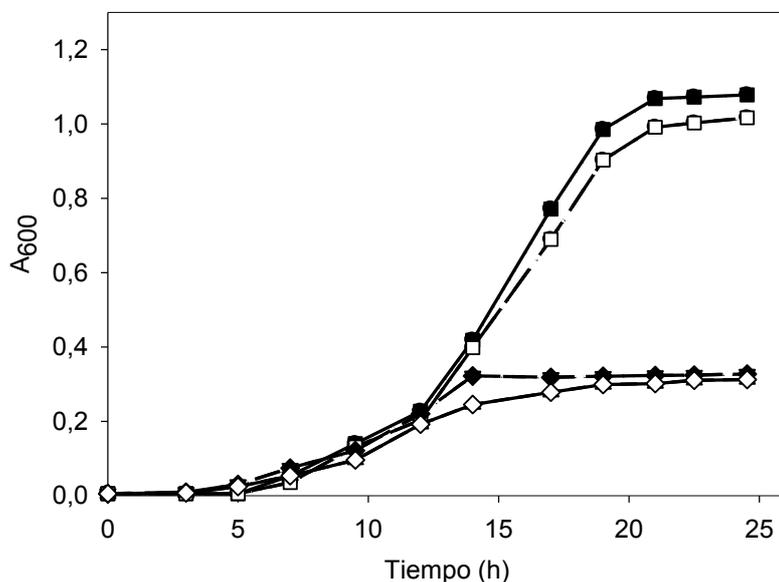


Figura 35: Crecimiento de las estirpes silvestre y mutante *dctP1* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. (●) Silvestre en amonio 10 mM; (○) mutante *dctP1* en amonio 10 mM; (◆) silvestre en amonio 2 mM; (◇) mutante *dctP1* en amonio 2 mM. En todos los casos la fuente de carbono fue acetato 50 mM. Los resultados mostrados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos realizados de forma independiente.

Por otro lado, las cepas silvestre y mutante *dctP1* de *P. pseudoalcaligenes* se cultivaron en medio mínimo M9 con NH_4Cl 4 mM y fuentes de 3 a 6 átomos de carbono, que fueron piruvato (C3) 35 mM, aspartato (C4) 30 mM, succinato (C4) 30 mM, fumarato (C4) 30 mM, malato (C4) 30 mM, 2-oxoglutarato (C5) 25 mM, glutamato (C5) 25 mM y citrato (C6) 20 mM, determinándose el crecimiento en los diferentes cultivos. Así, se encontró que el mutante *dctP1* creció peor que la estirpe silvestre con ácidos dicarboxílicos tipo C4, especialmente con aspartato con el que no creció, pero mostró un crecimiento mucho más rápido con ácidos dicarboxílicos de 5 átomos de carbono (Fig. 36). Con piruvato (C3) y citrato (C6) el crecimiento de la estirpe mutante *dctP1* fue ligeramente más rápido que el de la silvestre.

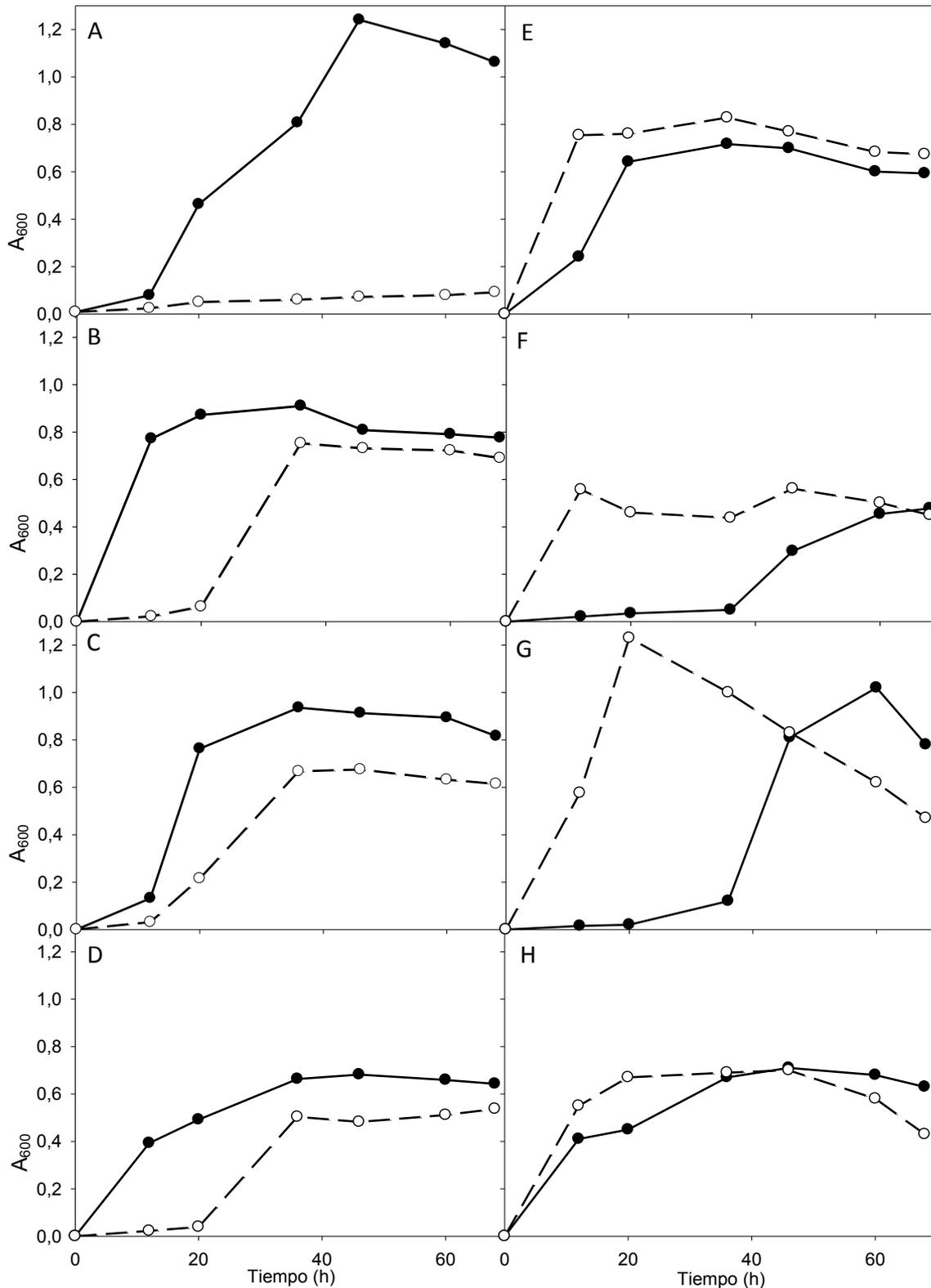


Figura 36: Crecimiento de las estirpes silvestre (●) y mutante *dctP1* (○) de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con diferentes fuentes de carbono. (A) aspartato 30 mM; (B) fumarato 30 mM; (C) malato 30 mM; (D) succinato 30 mM; (E) piruvato 35 mM; (F) 2-oxoglutarato 25 mM, (G) glutamato 25 mM y (H) citrato 20 mM. Las gráficas mostradas corresponden a un experimento representativo de cuatro independientes. La estirpe silvestre se representa con línea continua y la mutante con línea discontinua.

Para conocer el fenotipo del mutante *dctPI*⁻ en presencia de cianuro, se precultivó, junto con la cepa silvestre CECT5344 en medio mínimo M9 con acetato 50 mM y NH₄Cl 2 mM. Tras 24 horas, cuando se había consumido todo el amonio, se le añadió NaCN 2 mM a los cultivos y se determinó el crecimiento (A_{600}), el consumo de cianuro y la producción de 2-oxoácidos (Fig. 37), ya que la producción de oxalacetato (un α -cetoácido) forma parte de la ruta de asimilación de cianuro en la estirpe CECT5344. El NaCN reacciona químicamente con el oxalacetato producido y se forma su cianhidrina que puede ser utilizada como fuente de nitrógeno para el crecimiento de la estirpe CECT5344 (Luque-Almagro *et al.*, 2011b; Estepa *et al.*, 2012).

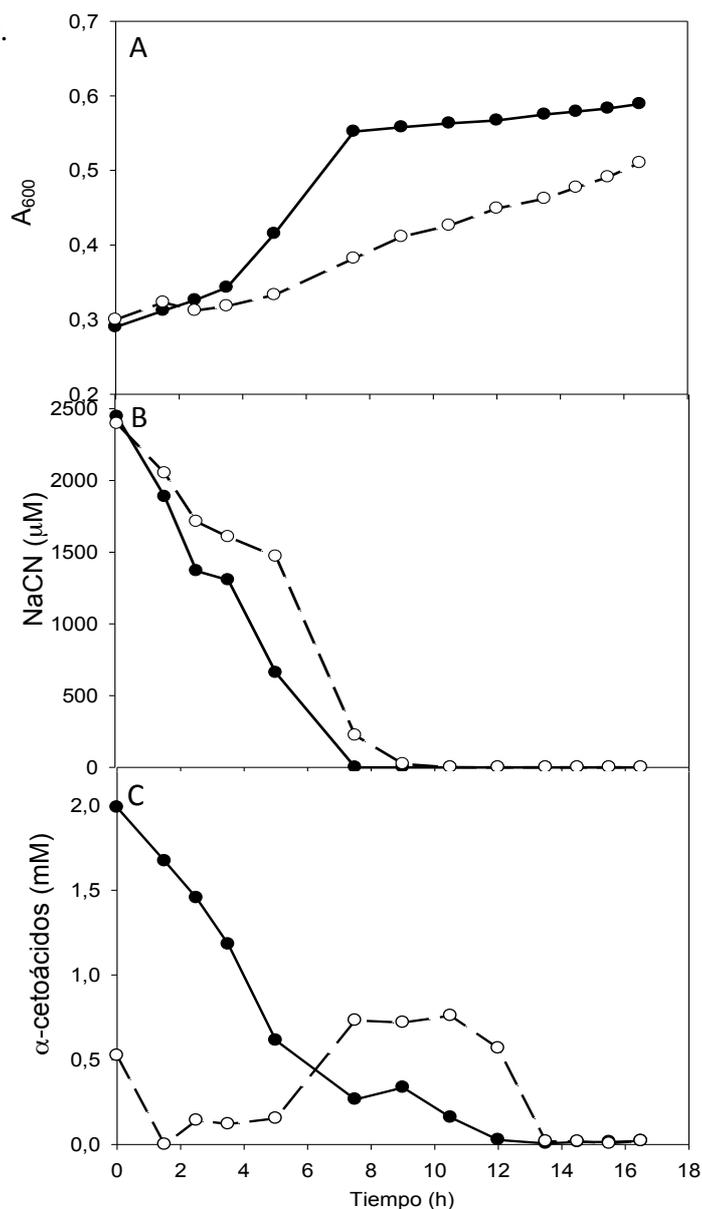


Figura 37: Caracterización de las estirpes silvestre (●) y mutante *dctPI*⁻ (○) de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con acetato 50 mM y NaCN 2 mM. Se determinó crecimiento (A), el consumo de cianuro (B) y la producción de α -cetoácidos (C). Los resultados mostrados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos realizados de forma independiente. La estirpe silvestre se representa con línea continua y la mutante con línea discontinua.

La estirpe *dctP1*⁻ mostró un retraso en su crecimiento con cianuro con respecto a la estirpe silvestre y el consumo de CN⁻ también fue inferior al mostrado por la estirpe silvestre. Además, se observa un patrón de acumulación de α -cetoácidos diferente para las estirpes silvestre y mutante (Fig. 37). El fenotipo del mutante *dctP1*⁻ en presencia de cianuro es compatible con el hecho de que en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 pueden existir otros genes homólogos a *dctP*. Así, en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se encuentran varias agrupaciones génicas que codifican sistemas de transporte tipo TRAP (Luque-Almagro *et al.*, 2013). En el operón mostrado en la figura 38, los genes *dctP2*, *dctQ2* y *dctM2* codifican proteínas homólogas al primer transportador TRAP. Los genes BN5_1315 y BN5_1318 adyacentes podrían realizar una función reguladora similar a la de los genes *dctB1* y *dctD1* (Fig. 33).



Figura 38: Entorno génico del gen *dctP2*. Los genes BN5_1315 y BN5_1319 codifican posibles proteínas reguladoras citoplasmáticas; *dctP2* codifica una proteína de unión al sustrato en el periplasma; *dctQ2* codifica una pequeña proteína integral de membrana y *dctM2* codifica una proteína integral de membrana de gran tamaño.

4.2.7. Mutagénesis del gen *dctP2* y caracterización de los mutantes *dctP2Q2*⁻ y *dctP1*⁻ / *dctP2Q2*⁻

Con el fin de conocer si el sistema transportador de tipo TRAP2 homólogo al sistema TRAP1 de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 tiene un papel en la asimilación de cianuro, se construyó mediante delección/inserción un mutante *dctP2Q2*⁻ de la estirpe CECT5344.

Mediante PCR se amplificó un fragmento de 2 200 pb que comprendía parte de los genes *dctP2* y *dctQ2*, usando como cebadores los oligonucleótidos *dctP2F* y *dctQ2R* (Tabla 11) y DNA genómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 como molde. El producto resultante se clonó en el vector de clonación pGEMT Easy, obteniéndose el plásmido pGEMT-*dctP2Q2* (Fig. 39). El fragmento *dctP2Q2* fue interrumpido por delección e inserción del cassette de resistencia a kanamicina en los sitios de restricción *Bam*HI y *Xho*I. Este plásmido se digirió con la enzima de restricción *Xba*I y se obtuvo un fragmento de 1 510 pb que contenía parte de los genes *dctP2* y *dctQ2* y el cassette kanamicina. Dicho fragmento se clonó como un

fragmento *Xba*I en el vector pK18mob δ E, que también presenta un marcador de resistencia a kanamicina, obteniéndose el plásmido pK18mob δ E-*dctP2Q2* (Fig. 39). Este plásmido se transfirió mediante conjugación desde la estirpe donadora *E. coli* S17-1 a la estirpe silvestre receptora CECT5344 de *P. pseudoalcaligenes*, obteniéndose mediante recombinación homóloga el mutante *dctP2Q2*⁻. Para la selección del mutante se sembraron los transconjugantes en medio rico LB con kanamicina y ácido nalidíxico, siendo las colonias resistentes las posibles portadoras del gen *dctP2Q2* mutado. Para comprobar la mutación se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos *dctP2F* y *dctQ2R* (Tabla 11) y el tamaño del fragmento de PCR obtenido fue de 1 510 pb, lo que confirmó la presencia de la mutación (Fig. 39).

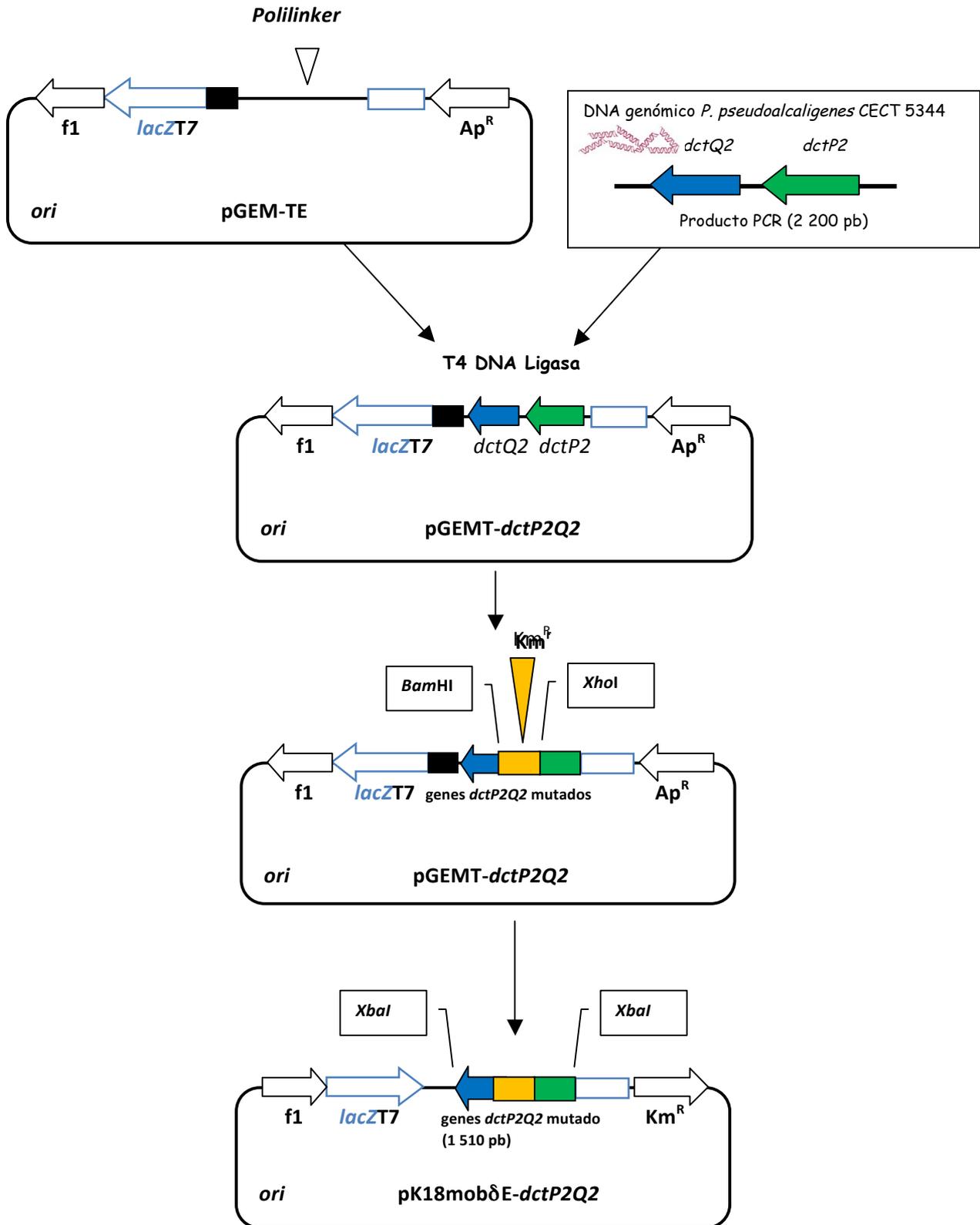


Figura 39: Construcción del mutante *dctP2Q2⁻*. Las abreviaturas utilizadas son: T7, promotor de la RNA polimerasa del fago T7; *lacZ*, gen que codifica la β-galactosidasa; *f1*, región del fago 1 y *ori*, origen de replicación del plásmido; *Ap^R*, cassette de resistencia a ampicilina; *Km^R*, cassette de resistencia a kanamicina.

Una vez generados los mutantes *dctP1⁻* y *dctP2Q2⁻* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 afectados en los componentes periplásmicos de los transportadores tipo TRAP, se procedió a generar un doble mutante *dctP1⁻/dctP2Q2⁻*. La cepa mutante *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 *dctP2Q2⁻* actuó como estirpe receptora y la cepa *E. coli* S17-1 portadora del plásmido pK18mob δ E-*dctP1* actuó como donadora en un proceso de conjugación, obteniéndose mediante recombinación homóloga el mutante doble *dctP1⁻/dctP2Q2⁻*. Para la selección del mutante doble, se sembraron los transconjugantes en medio rico LB con ácido nalidíxico, kanamicina y gentamicina. Para comprobar la inserción del cassette se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos *dctP2ExtF* y *dctQ2ExtR* (Tabla 11). El producto de PCR se digirió con la enzima de restricción *PstI* y la obtención del fragmento de unas 1 000 pb del cassette de gentamicina confirmó la doble mutación.

Para la caracterización de los mutantes obtenidos, la cepa silvestre y las estirpes *dctP2Q2⁻* y *dctP1⁻/dctP2Q2⁻* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se cultivaron en medio mínimo M9 con NH₄Cl 2 mM y diferentes fuentes de carbono, como acetato (C2) 50 mM, fumarato (C4) 30 mM y succinato (C4) 30 mM (Fig. 40).

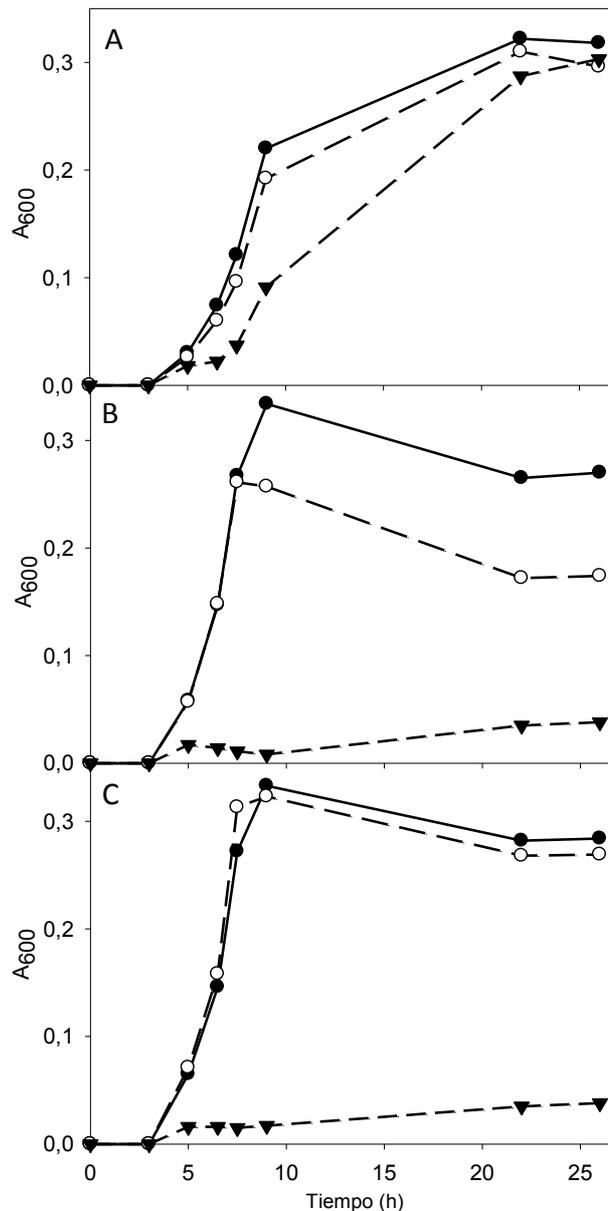


Figura 40: Crecimiento de la estirpe silvestre (●) y los mutantes *dctP2Q2*⁻ (○) y *dctP1*⁻/*dctP2Q2*⁻ (▼) de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con diferentes fuentes de carbono. (A) acetato 50 mM, (B) fumarato 30 mM y (C) succinato 30 mM. Los resultados mostrados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos realizados de forma independiente. La estirpe silvestre se representa con línea continua y los mutantes con línea discontinua.

Todas las estirpes crecieron con acetato, pero el mutante *dctP2Q2*⁻ creció más lentamente con fumarato y el mutante doble *dctP1*⁻/*dctP2Q2*⁻ fue incapaz de crecer con los compuestos C4 fumarato y succinato (Fig. 40). Con glutamato (C5), el comportamiento de los dos mutantes fue idéntico al de la cepa silvestre (no mostrado).

Para conocer el comportamiento de los mutantes *dctP2Q2*⁻ y *dctP1*⁻/*dctP2Q2*⁻ en presencia de cianuro, se precultivaron, junto con la cepa silvestre, en medio mínimo M9,

con acetato 50 mM y NH_4Cl 2 mM, y a las 24 horas, cuando se había consumido todo el amonio, se les añadió NaCN 2 mM y se midió el crecimiento, el consumo de cianuro y la producción de α -cetoácidos totales (Figura 41).

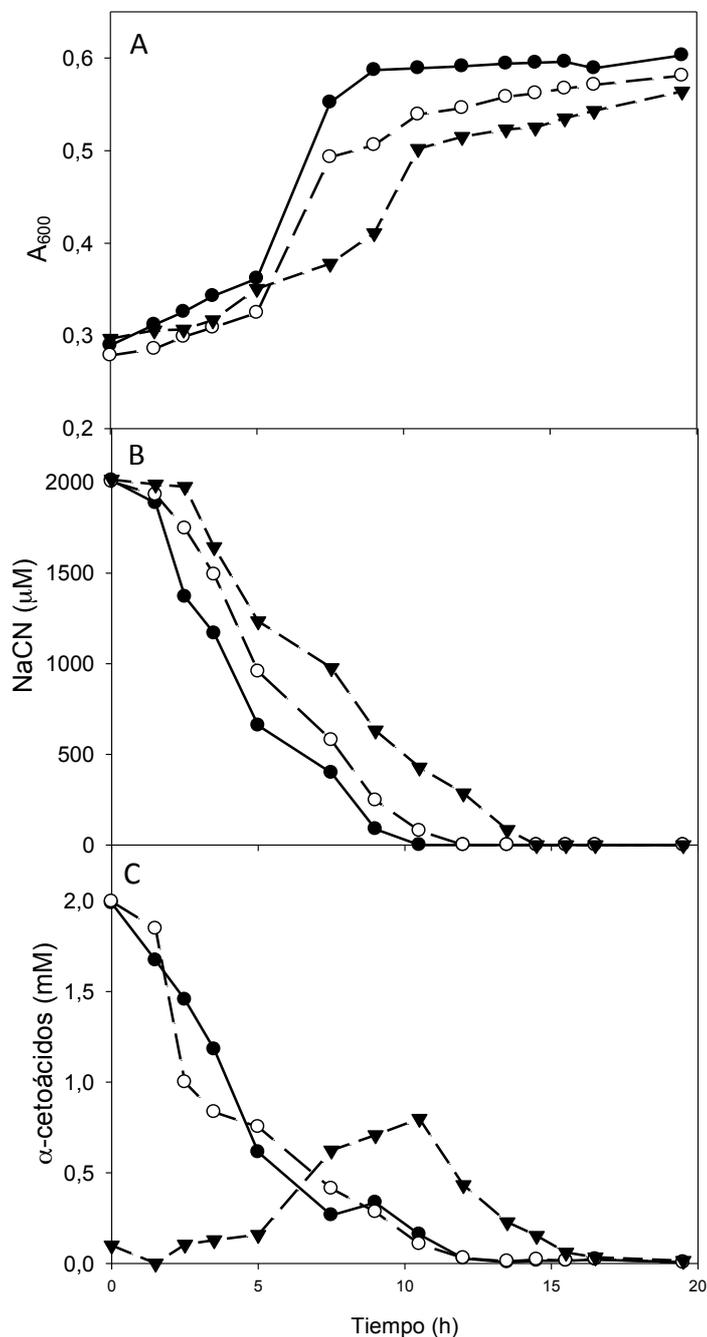


Figura 41: Curva de crecimiento de las estirpes silvestre (\bullet) y mutantes $dctP2Q2^-$ (\circ) y $dctPI^-/dctP2Q2^-$ (\blacktriangledown) de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con NaCN . Crecimiento bacteriano A_{600} (A), consumo de cianuro (B) y producción de cetoácidos (C). Los resultados mostrados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos realizados de forma independiente. La estirpe silvestre se representa con línea continua y los mutante con línea discontinua.

El crecimiento de los mutantes *dctP2Q2⁻* y *dctP1⁻/dctP2Q2⁻* fue menor que el mostrado por la estirpe silvestre. Esta diferencia también se reflejó en el consumo de cianuro. La acumulación de cetoácidos totales en el mutante *dctP2Q2⁻* fue similar a la estirpe silvestre, pero sin embargo, el doble mutante *dctP1⁻/dctP2Q2⁻* mostró un patrón de acumulación de cetoácidos muy diferente a los anteriores, aunque idéntico al mutante *dctP1⁻*.

4.2.8. Mutagénesis de los genes *dapA* y *ahpC* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 y caracterización de las estirpes mutantes

El análisis proteómico mediante 2D-PAGE mostró que las proteínas DapA y AhpC son inducibles por cianuro (Fig. 31, Tabla 21). El gen *dapA* codifica una dihidrodipicolinato sintasa (EC 4.2.1.52), enzima que actúa en el primer paso de la biosíntesis de lisina, aminoácido esencial en bacterias (Maringanti e Imlay, 1999). Una mutación en el gen *dapA* impide la síntesis de ácido dihidrodipicolínico, el cual, por la acción de la dipicolínico sintasa, produce ácido dipicolínico un compuesto que se ha descrito que puede actuar como quelante de hierro. En la figura 42 se muestra el entorno génico del gen *dapA* de *P. pseudoalcaligenes*. En la figura 43 se muestra la homología entre *dapA* de *P. pseudoalcaligenes* y otras dihidropicolinato sintasas.

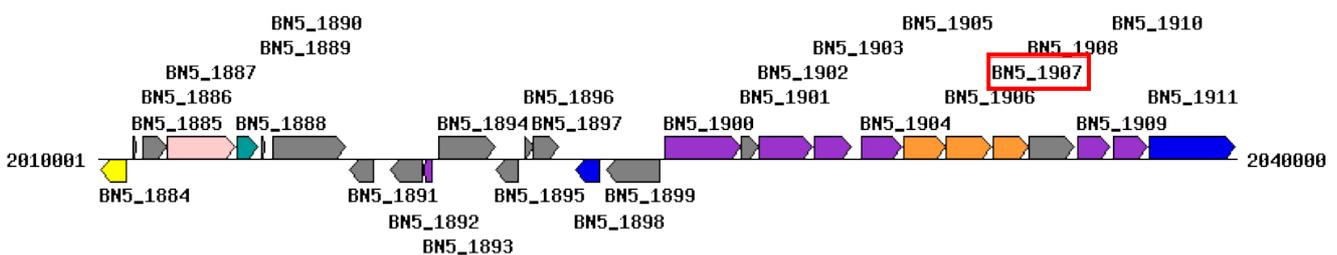


Figura 42: Entorno génico del gen *dapA* (BN5_1907) de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 que codifica la dihidrodipicolinato sintasa DapA; BN5_1912, nitrilasa Nit4; BN5_1911, malato deshidrogenasa MaeB3. Colores: naranja, metabolismo de aminoácidos; morado, metabolismo energético; azul, metabolismo de carbohidratos; rosa, metabolismo de cofactores y vitaminas; amarillo, procesamiento de la información del entorno; blanco, sin clasificación funcional.

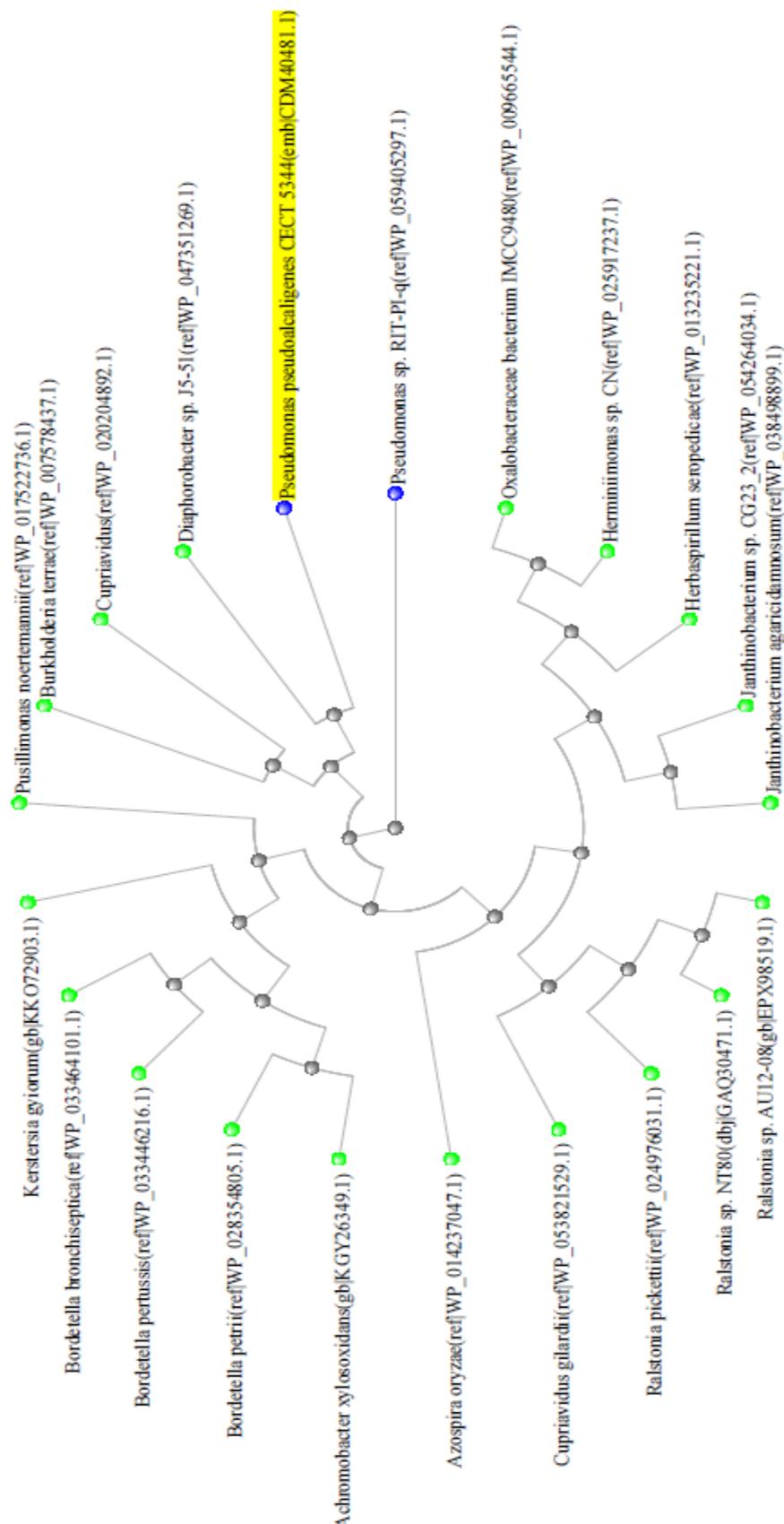


Figura 43: Relación filogenética de la proteína DapA de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con proteínas homólogas. El árbol filogenético se construyó a partir de un alineamiento de secuencias aminoácidas realizado mediante BLAST siguiendo el método NeighborJoining (Saitou y Nei, 1987). La máxima fracción permitida de bases no coincidentes en la región alineada entre cualquier par de secuencias fue de 0,85 y la distancia entre proteínas se determinó por el método de Grishin (1995)

La proteína DapA se ha encontrado inducida por cianuro en el análisis proteómico, pero su gen *dapA* no se ha detectado inducido por cianuro en los DNA microarrays de *P. pseudoalcaligenes*.

Este no es el caso de la proteína AhpC ya que el gen *ahpC* que la codifica sí se induce por cianuro. Las alquil-hidroperóxido reductasas (AhpCF) son enzimas responsables del metabolismo de los peróxidos orgánicos que están bien caracterizadas en bacterias. La mutación del gen *ahpC* en bacterias incrementa la sensibilidad a peróxidos orgánicos, llegando a producir mutagénesis espontánea y la muerte celular (Antelmann *et al.*, 1996). Además, mutantes en el gen *ahpC* de *Bacillus subtilis* presentan una hiperresistencia al H₂O₂ (Bsat *et al.*, 1996). En condiciones normales, la concentración intracelular de las especies reactivas de oxígeno (ROS) se encuentra por debajo de los niveles tóxicos debido a que la célula posee actividades enzimáticas que se encargan de eliminar estas ROS. Por ejemplo, el radical anión superóxido generado en el interior de la célula es rápidamente eliminado por la enzima superóxido dismutasa (SOD). De forma similar, las actividades enzimáticas catalasa, glutatión peroxidasa (GPX) y peroxirredoxina (Prx) son las encargadas de mantener niveles no tóxicos de H₂O₂ y otros peróxidos. La enzima catalasa protege a la célula de los efectos tóxicos del H₂O₂ al catalizar su descomposición en O₂ y H₂O. La figura 44 muestra el entorno génico del gen *ahpC* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. En la figura 45 se muestra la homología entre la proteína AhpC de *P. pseudoalcaligenes* y otras alquil hidroperóxido reductasas.

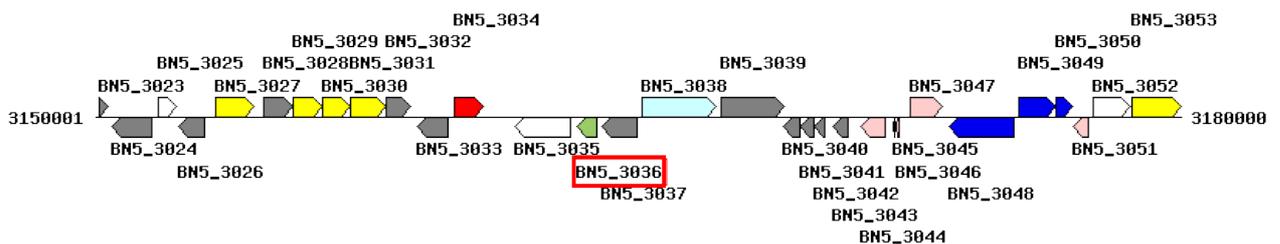


Figura 44: Entorno génico del gen *ahpC* (BN5_3036) de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 que codifica la alquil hidroperóxido reductasa. BN5_3035, subunidad F de la alquil hidroperóxido reductasa; BN5_3037, alcohol deshidrogenasa; BN5_3038, proteasa. Código de color: verde, procesos celulares; gris, no determinado; azul claro, enzima; rojo, metabolismo de nucleótidos; amarillo, procesamiento de la información del entorno; blanco, sin clasificación funcional.

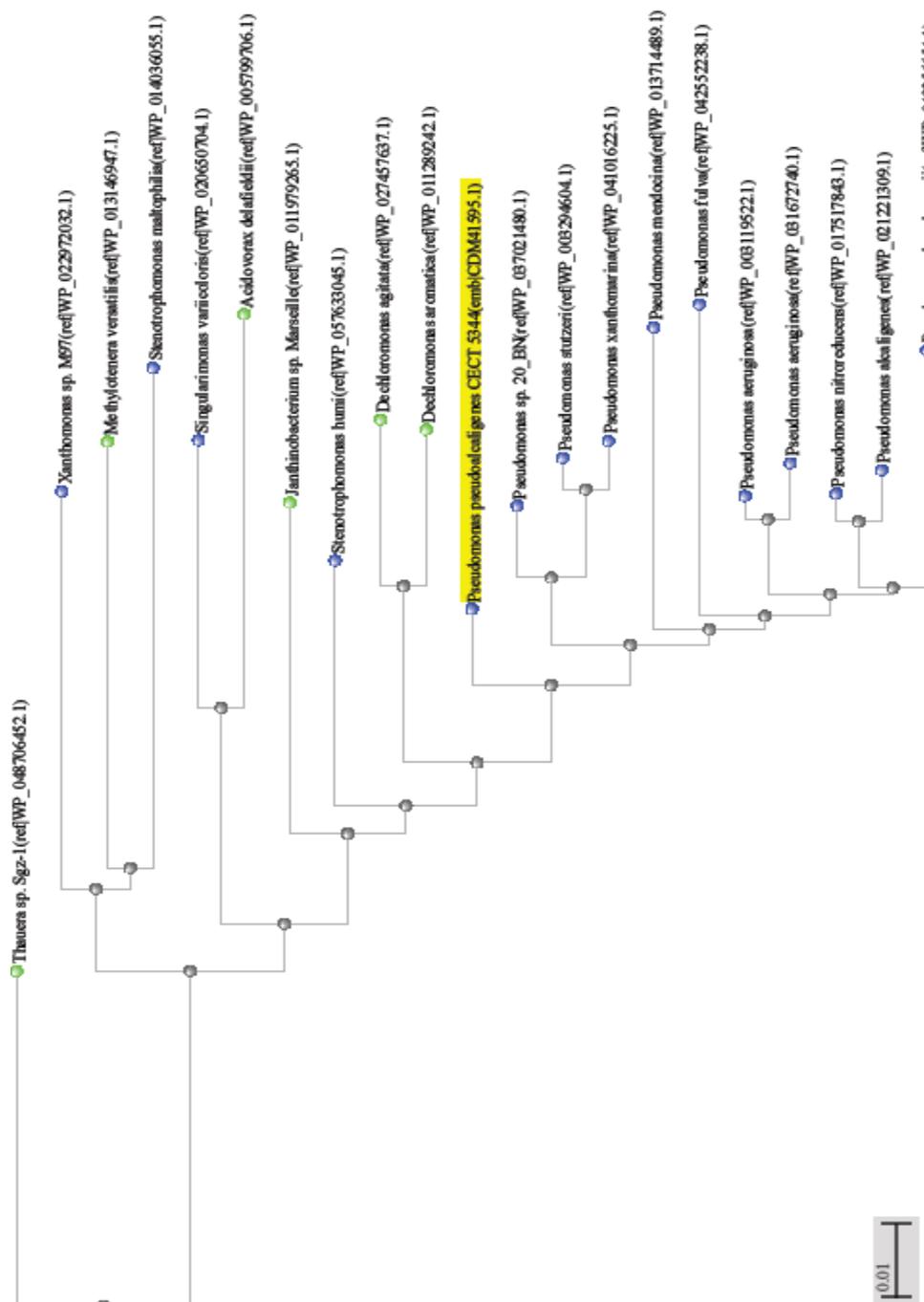


Figura 45: Relación filogenética de la proteína AhpC de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con proteínas homólogas. El árbol filogenético se construyó a partir de un alineamiento de secuencias aminoacídicas realizado mediante BLAST siguiendo el método NeighborJoining (Saitou y Nei, 1987). La máxima fracción permitida de bases no coincidentes en la región alineada entre cualquier par de secuencias fue de 0,85 y la distancia entre proteínas se determinó por el método de Grishin (1995). En azul se marcan miembros de γ -proteobacterias y en verde miembros de β -proteobacterias.

Con el fin de conocer el papel de los genes *dapA* y *ahpC* en la asimilación de cianuro por *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, se construyeron mutantes en dichos genes.

Para la construcción del mutante *dapA*⁻ (Fig. 46) se amplificó el gen BN5_1907 mediante PCR con los oligonucleótidos *dapAF* y *dapAR* (Tabla 11), obteniéndose un fragmento de 1 812 pb que fue clonado en pGEM-T. Usando dos sitios *EcoRI* en la parte central del fragmento clonado, la construcción se linealizó mediante digestión con *EcoRI*, clonando posteriormente en este sitio un cassette de resistencia a gentamicina previamente extraído como un fragmento *EcoRI* del vector pMS255. El fragmento correspondiente al gen *dapA* interrumpido por el cassette de resistencia a gentamicina se extrajo de pGEM-T usando los sitios de restricción *BamHI* y *HindIII* introducidos en los oligonucleótidos utilizados inicialmente. Este fragmento se clonó en el vector suicida pK18*mob* y la construcción resultante fue transferida finalmente a la estirpe S17-1 de *E. coli*, con la que se llevó a cabo la conjugación junto a la estirpe silvestre de *P. pseudoalcaligenes*.

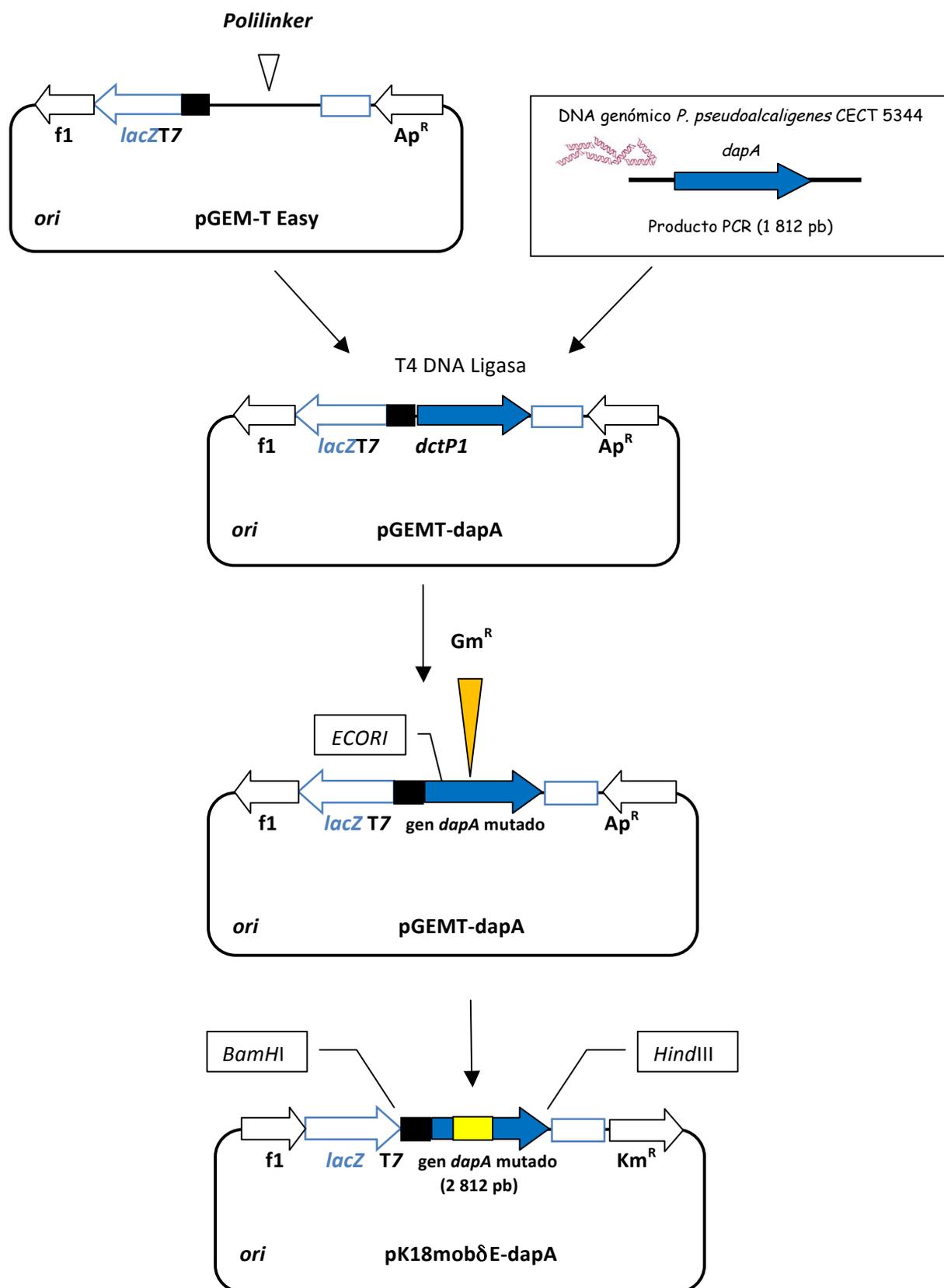


Figura 46: Construcción del mutante en el gen *dapA*. Las abreviaturas utilizadas son: T7, promotor de la RNA polimerasa del fago T7; *lacZ*, gen que codifica la β-galactosidasa; *f1*, región del fago 1 y *ori*, origen de replicación del plásmido; *Ap^R*, cassette de resistencia a ampicilina; *Gm^R*, cassette de resistencia a gentamicina; *Km^R*, cassette de resistencia a kanamicina.

El mutante de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 afectado en el gen *ahpC* (Fig. 47) se llevó a cabo amplificando por PCR con los oligonucleótidos *ahpCF* y *ahpCR* (Tabla 11) un fragmento de unas 500 pb, conteniendo dicho gen. El fragmento obtenido se clonó en el vector pGEM-Teasy, siendo posteriormente subclonado como *EcoRI/XmaI* en el vector suicida pK18mob. Esta construcción se transfirió de *E. coli* DH5 α a la estirpe S17-1, con la que se llevó a cabo la conjugación junto con la estirpe silvestre *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. La mezcla de conjugación se sembró en medios con ácido nalidíxico y kanamicina, por lo que los transconjugantes seleccionados fueron aquellos que mediante un único evento de recombinación insertaron toda la construcción, incluyendo el gen de resistencia a kanamicina, en el gen *ahpC* del genoma de la estirpe silvestre.

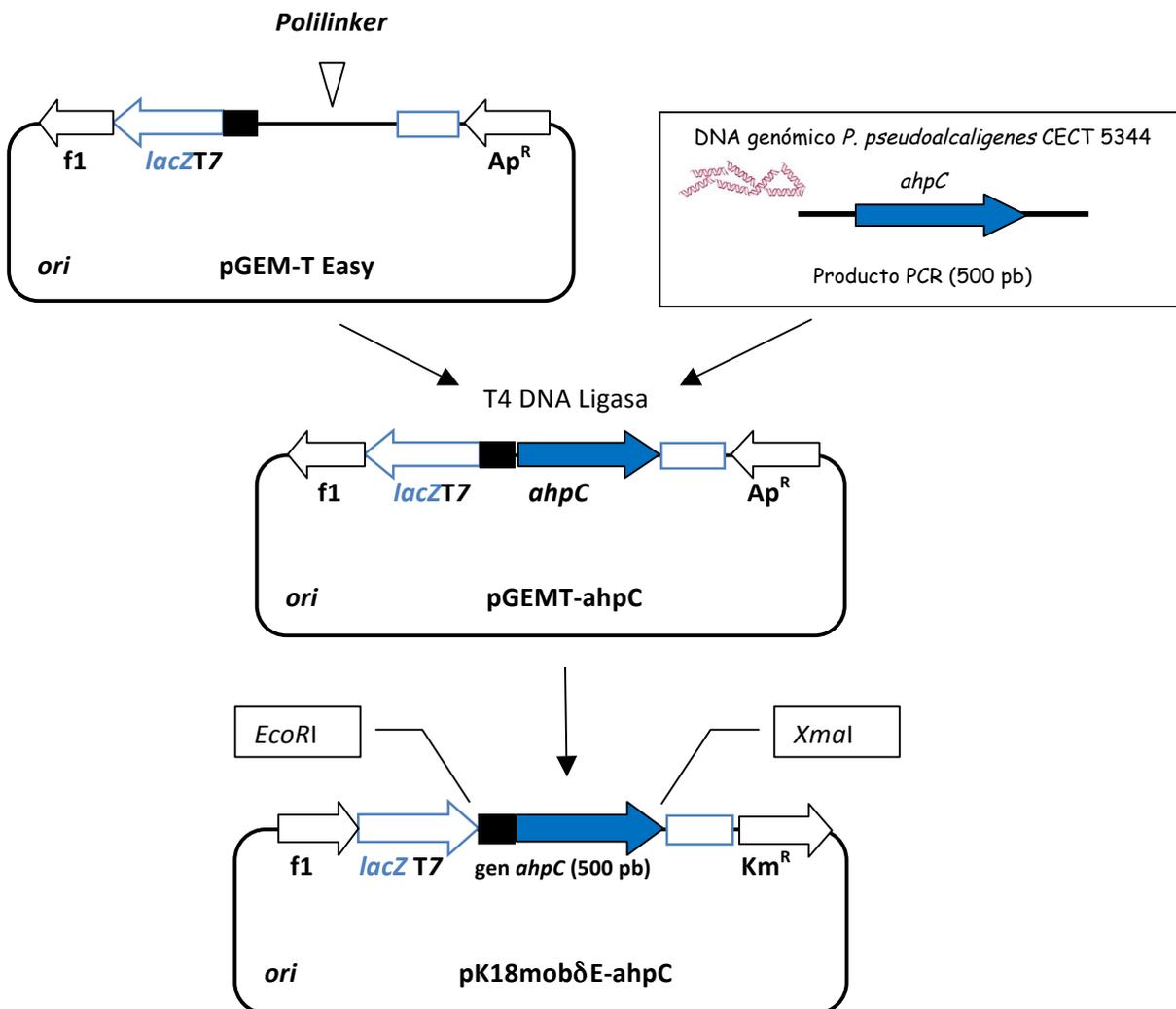


Figura 47: Construcción del plásmido pK18mob-*ahpC*. Las abreviaturas utilizadas son: T7, promotor de la RNA polimerasa del fago T7; *lacZ*, gen que codifica la β -galactosidasa; *f1*, región del fago 1 y *ori*, origen de replicación del plásmido; *Ap^R*, cassette de resistencia a ampicilina; *Km^R*, cassette de resistencia a kanamicina.

Para estudiar el efecto de la mutación en el gen *dapA* se precultivaron la cepa silvestre y el mutante *dapA*⁻ en medio mínimo M9 y NH₄Cl 2 mM. A las 24 horas, cuando se había consumido todo el amonio, se añadió NH₄Cl 2 mM y dipicolinato 3 mM. El mutante *dapA*⁻ creció de manera muy similar a la cepa silvestre y al final de la fase de crecimiento, tanto la cepa silvestre como la mutante alcanzan valores de A₆₀₀ parecidos (resultados no mostrados). Las estirpes silvestre y mutante *dapA* también se cultivaron en medios LB a pH 9,5 sin y con NaCN 2 mM. En ausencia de cianuro se observó un pequeño retraso del crecimiento del mutante *dapA*⁻ pero transcurridas varias horas creció sin diferencias significativas con respecto a la estirpe silvestre. En LB con NaCN, el mutante *dapA*⁻ siempre presentó un crecimiento significativamente menor que la estirpe silvestre (resultados no mostrados).

Para conocer el efecto de las mutaciones en los genes *dapA* y *ahpC* en presencia de cianuro y su relación con la homeostasis del hierro y el estrés oxidativo, se cultivaron dichos mutantes y la silvestre en medio mínimo M9 con amonio como fuente de nitrógeno y con desferrioxamina (Fig. 48). Ambos mutantes mostraron un crecimiento similar, ligeramente inferior el de la estirpe silvestre en ausencia de desferrioxamina pero mucho más lento que en el silvestre en presencia del quelante de hierro.

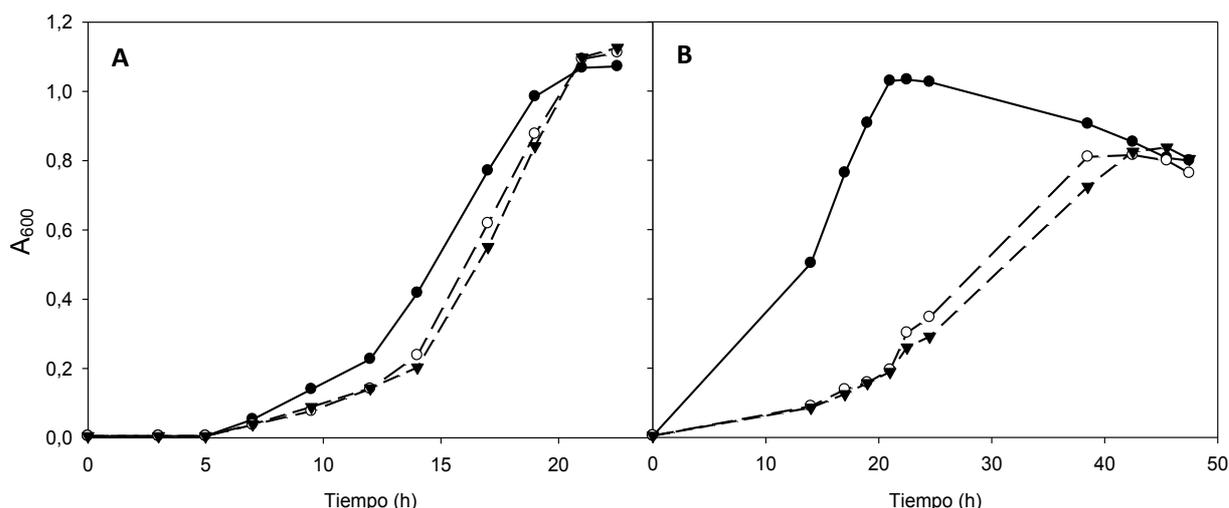


Figura 48: Efecto de la desferrioxamina en los mutantes *dapA*⁻ y *ahpC*⁻. Crecimiento de la estirpe silvestre (●) y los mutantes *dapA*⁻ (○) y *ahpC*⁻ (▼) con NH₄Cl 10 mM (A) y con NH₄Cl 10 mM y desferrioxamina 50 μM (B). Las gráficas mostradas corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes. La estirpe silvestre se representa con línea continua y los mutantes con línea discontinua.

Las estirpes mutantes y la cepa silvestre también se cultivaron en medio mínimo M9 con cianuro o el residuo de la joyería (ambos a una concentración de 2 mM) como única fuente de nitrógeno (Fig. 49).

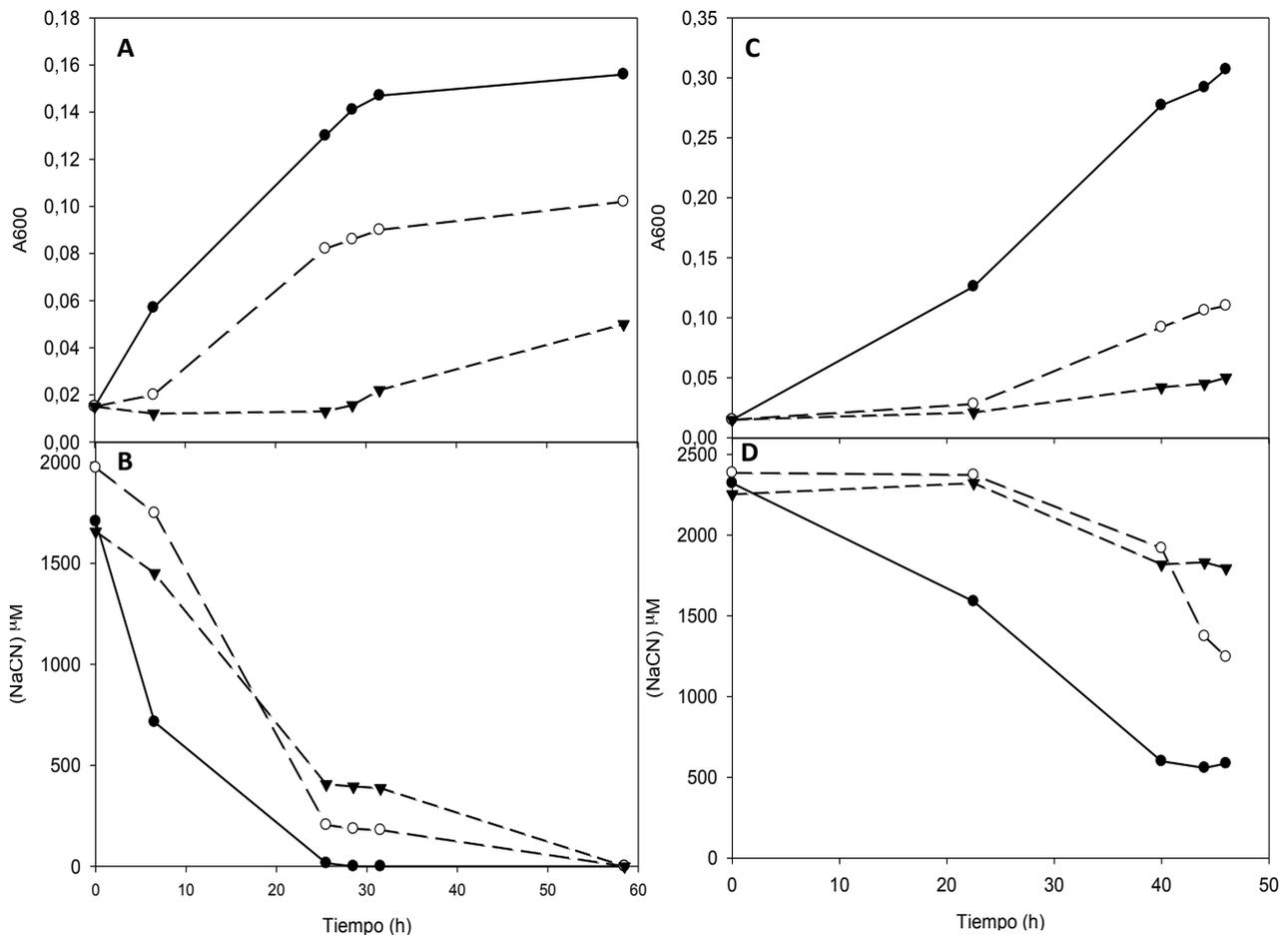


Figura 49: Crecimiento con cianuro de la estirpe silvestre (●) y mutantes *dapA*⁻ (○) y *ahpC*⁻ (▼). (A) crecimiento con NaCN 2 mM; (B) consumo de NaCN; (C) crecimiento con residuo joyero (CN⁻ 2 mM). (D) consumo del NaCN presente en el residuo joyero. Las gráficas mostradas corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes. La estirpe silvestre se representa con línea continua y los mutantes con línea discontinua.

Tanto en el medio con NaCN como con el residuo joyero, los mutantes *dapA*⁻ y *ahpC*⁻ crecieron menos que la estirpe silvestre, siendo esta inhibición del crecimiento más acusada en el caso del residuo joyero y en el mutante *ahpC*⁻, que siempre mostró un crecimiento menor.

Un análisis detallado del mutante *ahpC*⁻ reveló alteraciones en otras actividades tipo catalasa. En otros géneros bacterianos, la catalasa monofuncional Kat1, y en menor medida, la catalasa-peroxidasa bifuncional, aumentan significativamente su actividad, mientras que la activada de KatE apenas se altera (Chander y Demple, 2004; Lee *et al.*,

2004). Para estudiar el papel de la proteína *AhpC* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en la detoxificación de H_2O_2 , las estirpes silvestre y *ahpC*⁻ se cultivaron en medio mínimo M9 con NH_4Cl 5 mM en presencia de H_2O_2 3,52 mM ó 5,28 mM (Fig. 50).

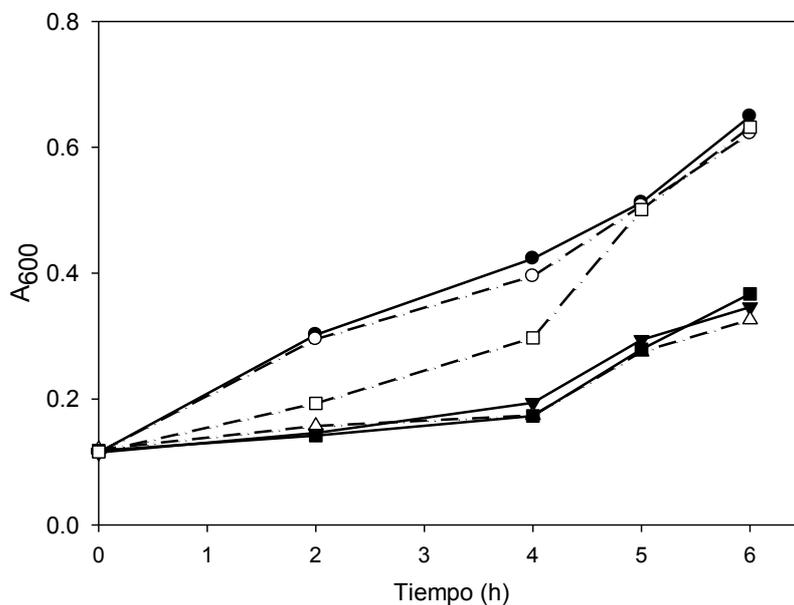


Figura 50: Efecto del H_2O_2 en las estirpes silvestre y mutante *ahpC*⁻. Estirpe silvestre (●) y mutante (○) sin H_2O_2 ; estirpe silvestre (▼) y mutante (△) con H_2O_2 3,52 mM; estirpe silvestre (■) y mutante (□) con H_2O_2 5,28 mM, La gráfica mostrada corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes. La estirpe silvestre se representa con línea continua y la mutantes con línea discontinua.

Sin H_2O_2 o con una concentración de H_2O_2 de 3,52 mM, ambas estirpes crecieron igual. Sin embargo, a una concentración de H_2O_2 5,28 mM, el mutante *ahpC*⁻ creció el doble que la estirpe silvestre, sugiriendo que el mutante es resistente a altas concentraciones de H_2O_2 . Se cultivó la estirpe silvestre y el mutante *ahpC*⁻ con concentraciones más elevadas de H_2O_2 con el fin de averiguar aquella concentración de H_2O_2 a la que la estirpe silvestre deja de crecer mientras que la estirpe mutante muestra resistencia. Se probaron concentraciones de H_2O_2 superiores. Cuando la concentración fue 8,8 mM, se produjo muerte celular en la cepa silvestre y sin embargo se detectó un gran crecimiento en el mutante *ahpC*⁻ (Fig. 51). Por lo tanto, el mecanismo de hiperresistencia del mutante *ahpC*⁻ sólo se activa a partir de una determinada concentración de H_2O_2 y su acción se potencia a medida que aumenta la cantidad de H_2O_2 en el medio.

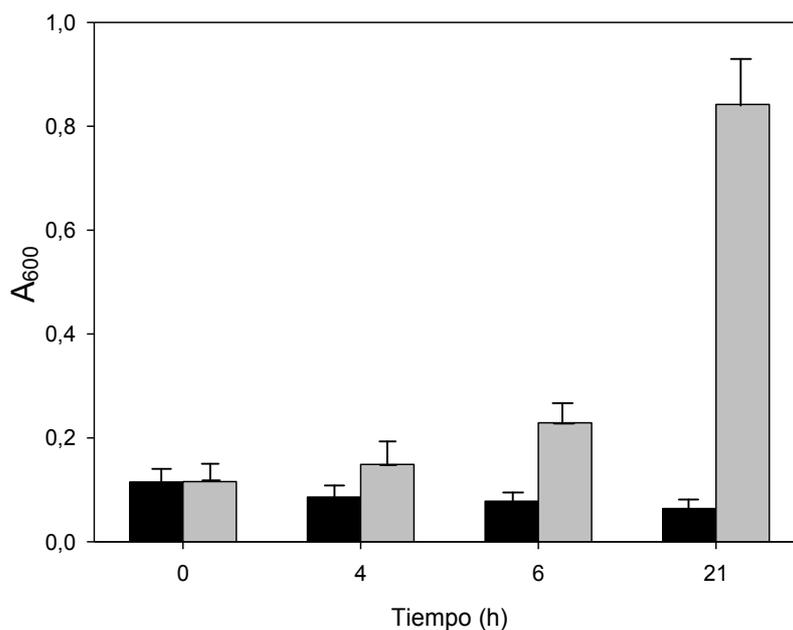


Figura 51: Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* silvestre (■) y mutante *ahpC*⁻ (■) con H₂O₂ 8,8 mM. Las estirpes se cultivaron en medio mínimo M9 y NH₄Cl 5 mM.

Para saber si esta gran resistencia al peróxido de hidrógeno de la estirpe *ahpC*⁻ es debida a una mayor actividad catalasa, la estirpe silvestre *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 y el mutante *ahpC*⁻ se cultivaron en medio mínimo M9 con NH₄Cl 5 mM y cuando el crecimiento alcanzó una A₆₀₀ de aproximadamente 0,1, a la mitad de los cultivos se les añadió H₂O₂ 5,28 mM. A las 6,5 horas, cuando había diferencias claras en el crecimiento entre la estirpe silvestre y la mutante que podrían corresponderse con diferencias en la actividad catalasa, se recogieron las células y se prepararon las muestras según el procedimiento descrito en materiales y métodos para determinar la actividad catalasa. Como puede observarse en la figura 52, el mayor crecimiento del mutante *ahpC*⁻ se correspondió a una mayor actividad catalasa, que fue prácticamente el doble que en la cepa silvestre.

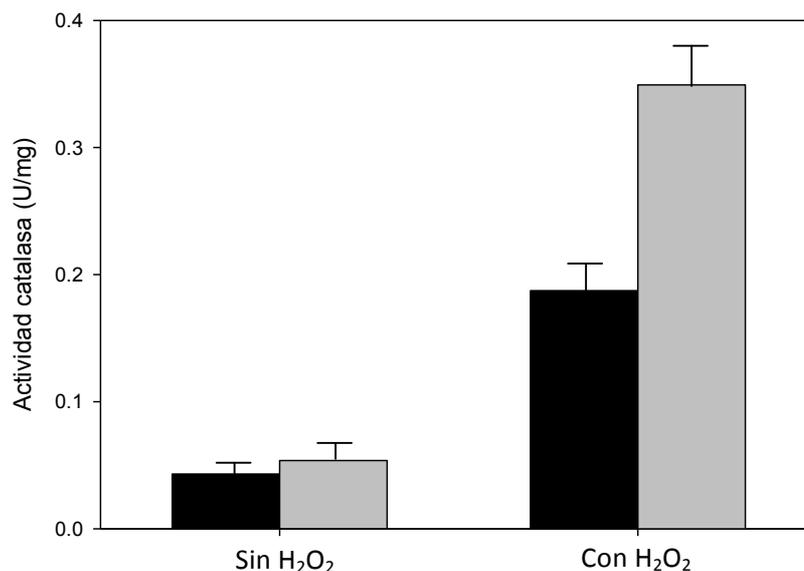


Figura 52: Actividad catalasa de la estirpe silvestre *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (■) y el mutante *ahpC*⁻ (▒). La actividad se determinó después de 6,5 horas de crecimiento sin H₂O₂ o con H₂O₂ 5,28 mM.

La mutación en el gen *ahpC* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 produjo una hiperresistencia al H₂O₂ a la vez que duplicó su actividad catalasa. Para determinar si este comportamiento del mutante *ahpC*⁻ también tenía lugar durante el crecimiento con cianuro, se cultivó esta estirpe mutante en medio mínimo M9 con NH₄Cl 2 mM o NaCN 2 mM, inoculando con células del mutante *ahpC*⁻ hasta una A₆₀₀ inicial de aproximadamente 0,1. Se le añadió H₂O₂ 8,8 mM, dejando un cultivo control sin añadir H₂O₂. (Fig. 53).

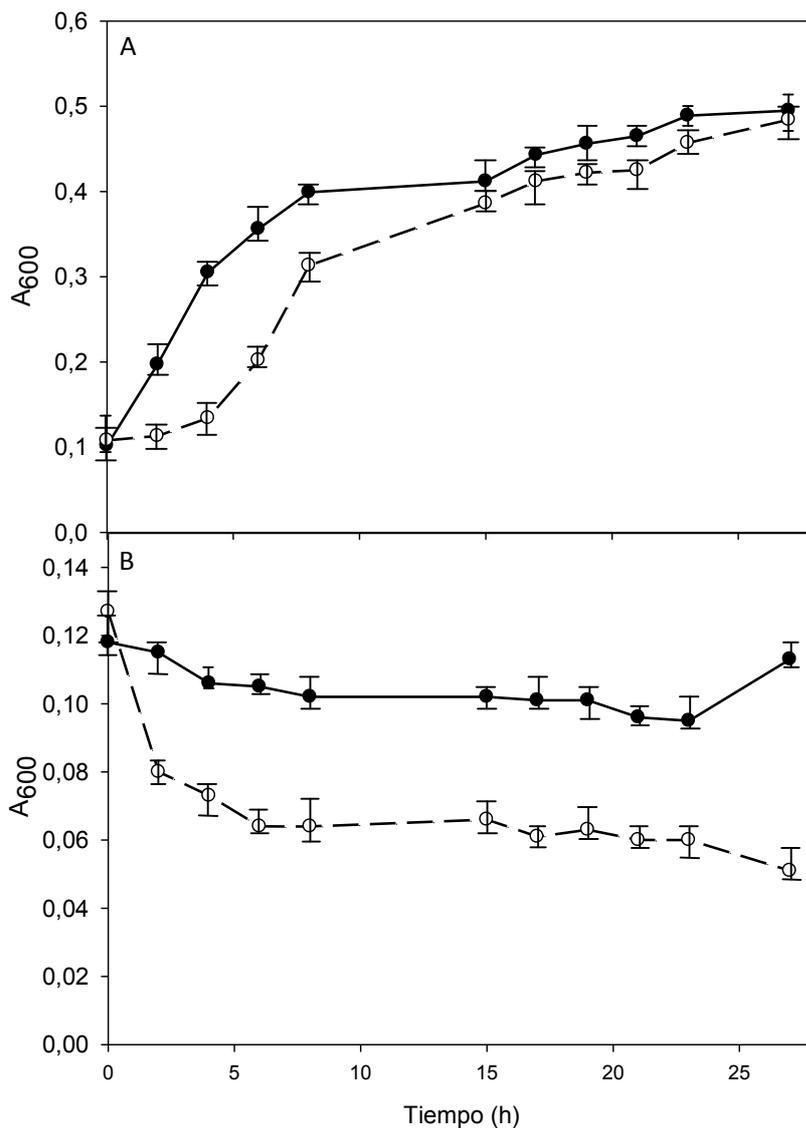


Figura 53: Crecimiento del mutante *ahpC*⁻ con NH₄Cl o cianuro en presencia de H₂O₂ 8,8 mM. (A) NH₄Cl 2 mM sin H₂O₂ (●) o con H₂O₂ 8,8 mM (○); (B) NaCN 2 mM sin H₂O₂ (●) o con H₂O₂ 8,8 mM (○)

Como puede observarse, la hiperresistencia mostrada por el mutante *ahpC*⁻ al H₂O₂ en medios con amonio no le confiere mayor resistencia ni capacidad para asimilar cianuro.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA RESPUESTA A CIANURO

Existen numerosos estudios en los que se describe el aislamiento de microorganismos (bacterias y hongos) con la capacidad de utilizar cianuro como fuente de nitrógeno (Ebbs, 2004). En estos microorganismos cianotrofos se ha estudiado fundamentalmente la ruta de asimilación de cianuro, estableciéndose la existencia de cuatro tipos de rutas de degradación de este tóxico: oxidativas, hidrolíticas, reductivas y de sustitución/adición (Ebbs, 2004). A pesar de la existencia de numerosos trabajos bioquímicos sobre la degradación de cianuro, los estudios sobre el efecto del cianuro en bacterias a nivel global son escasos. La alta reactividad del cianuro sugiere que este compuesto debe provocar grandes cambios moleculares en las células, por lo que la aplicación de las técnicas ómicas al estudio del metabolismo del cianuro podría ampliar nuestro conocimiento sobre el efecto de este tóxico en bacterias capaces de asimilarlo. A nivel proteómico existen algunos estudios previos, realizados en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 y en *Klebsiella oxytoca*, donde se describe que el cianuro induce proteínas de resistencia a estrés oxidativo y proteínas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno y la homeostasis de hierro (Luque-Almagro *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2010). La ausencia en estas bacterias de genomas secuenciados limitó en estos estudios la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas. Actualmente existen sólo tres genomas secuenciados de bacterias cianotrofas, entre las que se encuentran *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, primer organismo cianotrofo secuenciado, *Pseudomonas fluorescens* NCIMB11764 y *Azotobacter chroococcum* (Luque-Almagro *et al.*, 2016). De estos genomas sólo el de la estirpe CECT5344 ha sido secuenciado completamente, para lo que se utilizó la técnica de secuenciación masiva PacBio (Wibberg *et al.*, 2014).

Si bien los estudios genómicos y proteómicos de la degradación de cianuro son escasos, hasta la realización de esta Tesis Doctoral no se había llevado a cabo ningún análisis transcriptómico de la respuesta global al cianuro en un microorganismo cianotrofo. Tan sólo se ha descrito el efecto del cianuro sobre la expresión génica en una bacteria resistente al cianuro pero incapaz de asimilarlo, *Nitrosomonas europaea* (Park y Ely, 2009).

En esta Tesis Doctoral se describe, por primera vez, el transcriptoma de una bacteria, *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, en condiciones de resistencia y asimilación de cianuro. Los resultados obtenidos se han publicado recientemente (Luque-Almagro *et al.*, 2015). *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 es una estirpe cianotrofa que se caracteriza por ser alcalófila, lo que la convierte en una bacteria idónea para la degradación de cianuro por la posibilidad de utilizar condiciones alcalinas y por tanto minimizar la pérdida de cianuro en forma de gas cianhídrico. El análisis del transcriptoma de esta bacteria en presencia de cianuro se ha llevado a cabo mediante microarrays de DNA, una tecnología ampliamente utilizada en el estudio de la expresión génica masiva en bacterias en respuesta a factores ambientales.

Los microarrays utilizados en este trabajo siguieron un diseño tipo bucle y usando una tecnología de dos colores (dos canales) (Fig. 8). El diseño tipo bucle presenta la ventaja de que, individualmente, los arrays están balanceados porque cada muestra es hibridada con los dos fluoróforos. Sin embargo, el análisis estadístico presenta una mayor complejidad. La tecnología de dos colores permite comparar niveles de expresión relativos entre una pareja de muestras en cada microarray. La ventaja de esta tecnología frente a la de un color es que permite comparar directamente dos muestras en un mismo experimento de hibridación, evitando la variabilidad que pueda existir entre arrays.

Durante el preprocesamiento de los datos obtenidos en los microarrays se estimó que la calidad de los mismos era correcta, como demostraba la distribución de intensidades y los diagramas de cajas realizados con los datos brutos (Fig. 10). La posterior normalización de los datos permitió corregir las diferencias en las distribuciones de los valores de intensidad de los distintos arrays (Figs. 11 y 12). Una vez confirmada la calidad de los resultados obtenidos se procedió al análisis de los mismos. Este estudio incluyó la búsqueda de patrones de correulación mediante análisis principal de componentes y métodos de agrupamiento (clustering), modelos para estudios de expresión diferencial y métodos de análisis basados en la ontología génica para buscar significación biológica. Una primera aproximación al análisis de los microarrays consistió en la división del conjunto de datos en grupos de propiedades similares. Tanto el análisis principal de componentes PCA (Fig. 14) como los dendogramas obtenidos mediante clustering jerárquico (Fig. 15), mostraron que las réplicas de cada condición se agruparon entre sí. En el PCA, la principal fuente de variación (eje X) se asoció a la fuente de nitrógeno, mientras que la segunda

fuente de variación se asoció con la presencia/ausencia de cianuro (Fig. 14). Además, como se observa en los dendogramas de las figura 15, las muestras de cianuro y del residuo se agruparon en un clúster. Todos estos resultados confirmaron la validez de las muestras y del experimento. Los dendogramas también revelaron que la condición cianuro estuvo más cercana a la condición -N que a la de NH_4Cl (Fig. 15), lo que sugiere que las condiciones de cianotrofia y de hambre de nitrógeno comparten algunos procesos biológicos, observación descrita en trabajos proteómicos previos (Luque-Almagro *et al.*, 2007). A pesar de que estas dos condiciones se agruparon cercanas, el efecto que tuvo la limitación de nitrógeno sobre el transcriptoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, utilizando amonio como referencia, fue mucho más drástico que el ocasionado por el cianuro (Figs. 16 A y 17). Ninguna de estas condiciones ejerció un claro efecto neto inductor o represor sobre la expresión génica de la bacteria (Fig. 16 B). En otros microorganismos donde se ha estudiado el efecto del hambre de nitrógeno sobre la expresión génica, tampoco se ha observado un efecto neto inductor o represor; sin embargo, el número de genes afectados fue muy inferior al observado en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. En *Haloferax mediterraneii* (Esclapez *et al.*, 2015), *Pseudomonas putida* (Hervás *et al.*, 2008), *Bacillus subtilis* (Jarmer *et al.*, 2002) y *Corynebacterium glutamicum* (Silberbach *et al.*, 2005) sólo se afectó entre el 5 y el 8% de genes totales presentes en el genoma, mientras que en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se afectó el 35%. Probablemente, una de las razones de esta diferencia fue la forma de generar las condiciones de hambre de nitrógeno en los distintos estudios. En *P. putida* y *C. glutamicum* estas condiciones se generaron con la adición de serina o glutamato como fuentes de nitrógeno, respectivamente, mientras que en el resto de estudios no se adicionó ninguna fuente de nitrógeno, aunque los tiempos de incubación en estas condiciones fueron diferentes.

Con objeto de analizar previamente la extensa información obtenida en los microarrays, se simplificó dicha información a nivel funcional realizando un enriquecimiento de términos GO (ontología génica) y agrupando los genes según categorías funcionales. En condiciones de hambre de nitrógeno, los términos GO de función biológica sobrerrepresentados entre los genes inducidos incluyeron "unión a DNA" y "actividad DNA polimerasa dirigida por RNA", mientras que entre los genes reprimidos se identificaron varios relacionados con la traducción, como "unión a tRNA" y "actividad factor de

elongación de la traducción", entre otros (Tabla 13). Estos resultados, junto con los GO enriquecidos correspondientes a procesos biológicos (Tabla 14) sugieren que en estas condiciones de estrés, *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 responde positivamente a nivel transcripcional y negativamente a nivel traduccional. Entre los términos GO sobrerrepresentados entre los genes inducidos por cianuro, tanto NaCN como residuo cianurado, se identificaron términos de función biológica relacionados con la afinidad del cianuro por los metales y determinados cofactores, como "unión a cobre", "unión a centros hierro-azufre" y "unión a piridoxal fosfato" (Tabla 15).

En *P. putida* se ha descrito que en hambre de nitrógeno se inducen genes dependientes del regulador global de nitrógeno NtrC, incluyendo genes de transportadores de aminoácidos y genes de asimilación de urea, el gen *glnK* que codifica la proteína PII y el gen *amtB* que codifica el transportador de amonio de alta afinidad (Hervás *et al.*, 2008). En condiciones limitantes de nitrógeno se potencia el almacenamiento de carbono, como sugiere la inducción del gen de la sintasa de polihidroxicanoatos y de genes que codifican fasinas (Hervás *et al.*, 2008). Estos genes también se indujeron en células de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 sometidas a hambre de nitrógeno (Tabla 16). Curiosamente, el gen *csrA*, un regulador del almacenamiento de carbono, se indujo también en condiciones limitantes de nitrógeno en la cepa CECT5344. En *Escherichia coli* se ha descrito que el producto del gen *csrA* actúa como represor por unión a un mRNA, impidiendo su traducción (Gutiérrez *et al.*, 2005). Esto podría ser un mecanismo para prevenir un exceso de flujo de catabolitos a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos en condiciones limitantes de nitrógeno. El análisis funcional de los genes de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 reprimidos en condiciones de escasez de nitrógeno reveló un alto número de genes codificantes de proteínas ribosomales, factores de traducción y proteínas de aminoacilación de tRNA (Luque-Almagro *et al.*, 2015a) indicando que en estas condiciones hay una disminución general de síntesis de proteínas, posiblemente relacionada con el estrés general al que están sometidas las células.

La ruta de asimilación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 consiste en la producción, en respuesta a cianuro, de oxalacetato por una malato:quinona oxidorreductasa. El cianuro y el oxalacetato reaccionan químicamente para producir una cianhidrina, que es rápidamente utilizada por la nitrilasa NitC para generar amonio, el cual es incorporado a esqueletos carbonados por el ciclo GS/GOGAT (Luque-Almagro *et al.*, 2011b; Estepa *et al.*,

2012). Los resultados obtenidos en los microarrays sobre la expresión génica de los genes que participan en la ruta de asimilación de cianuro permitieron conocer más detalles de aspectos desconocidos hasta el momento de esta ruta. El análisis del genoma completo de la cepa CECT5344 ha revelado la existencia de dos genes que codifican malato:quinona oxidorreductasas, *mqaA* (BN5_0860) y *mqaB* (BN5_1358). Estos genes comparten un 52% de identidad y un 71% de similitud. El programa TargetP ([tp://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/)) ha predicho inequívocamente una localización subcelular citoplasmática de la enzima MqoA, pero una localización subcelular no tan clara de la enzima MqoB, que podría localizarse tanto en el citoplasma como en el periplasma. El gen *mqaB* se indujo en presencia de residuo joyero mientras que el gen *mqaA* se expresó en las células cultivadas en todas las fuentes de nitrógeno estudiadas en este trabajo (Luque-Almagro *et al.*, 2015). Por lo tanto, en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 MqoA es esencial tanto en el metabolismo del carbono como en la ruta de asimilación/destoxificación del cianuro, pero la función del gen *mqaB*, que está específicamente inducido por el residuo cianurado, permanece desconocida.

El segundo aspecto de la ruta de asimilación de cianuro en el que los microarrays han permitido profundizar en conocimiento se refiere a la obtención de amonio a partir de la cianhidrina del oxalacetato. La nitrilasa NitC que utiliza esta cianhidrina como sustrato no sólo es inducida por cianuro, sino también por condiciones de limitación de nitrógeno. Curiosamente, el gen *nit3* que codifica otra nitrilasa se encontró específicamente inducido por cianuro. Sin embargo, estudios previos en los que una estirpe mutante deficiente en el gen *nitC* (también denominado *nit2*) fue incapaz de crecer con cianuro como única fuente de nitrógeno descartan la participación de esta nitrilasa Nit3 en la asimilación de cianuro (Estepa *et al.*, 2012).

Los genes de las nitrilasas *nitC* (*nit2*) y *nit4*, que codifica una nitrilasa de β -ciano, y un gen que codifica la enzima málica se indujeron en células cultivadas con cianuro sódico y con residuo joyero. La cianhidrina del oxalacetato (un nitrilo) que se produce durante la asimilación del cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Estepa *et al.*, 2012) podría actuar como inductora de otras nitrilasas como Nit4 que también utiliza nitrilos como sustratos. De este modo, la nitrilasa Nit4 podría contribuir a la actividad residual encontrada en el mutante NitC de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, aunque no es esencial

para la asimilación del cianuro en la cepa CECT5344 (Estepa *et al.*, 2012). La enzima málica cataliza la descarboxilación oxidativa de malato a piruvato, y su oxoácido también reacciona con el cianuro libre para producir una cianhidrina que puede ser asimilada a través de la nitrilasa NitC (Estepa *et al.*, 2012). Este proceso podría contribuir a disminuir la concentración de cianuro libre, que es mucho más tóxico y reactivo que sus formas orgánicas derivadas, las cianhidrinas.

Respecto a la resistencia a cianuro, el gen *cioB* que codifica una oxidasa terminal tipo *cbb3* necesaria para la respiración insensible a cianuro también se ha encontrado inducido tanto en cianuro sódico como en residuo joyero. El análisis de los mutantes en los genes *cioA* y *cioB*, que codifican las dos subunidades de la oxidasa terminal, reveló que estos genes son esenciales para la supervivencia en cianuro, ya que están implicados en la respiración insensible a cianuro (Quesada *et al.*, 2007). Varios genes que se indujeron en medios con cianuro y que codifican aminotransferasas dependientes-PLP están situados "aguas abajo" de los genes *cioAB*. Algunos de estos genes se cotranscriben con los genes *cioAB*, pero su papel en el metabolismo del cianuro aún no se conoce (Quesada *et al.*, 2007). El gen de la nitrilasa *nit4* se localiza también "aguas abajo" de los genes *cioAB* en la cepa CECT5344 y podrían también cotranscribirse con los genes *cioAB*. Los genes *isc* de unión a centros Fe-S, el gen *ahpC* de la alquil-hidroperóxido reductasa y el gen *fpr* (formyl peptide receptor) se indujeron también en cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2015). La alquil-hidroperóxido reductasa es una enzima que participa en la protección frente a hidroperóxidos orgánicos. En estirpes patógenas de *Staphylococci* existe una relación entre las proteínas AhpC y Hmp ya que ambas participan en la respuesta global al estrés oxidativo compartiendo reguladores globales (Gaupp *et al.*, 2012). Los centros Fe-S de muchas metalo-proteínas son una de las dianas de las especies reactivas de oxígeno, por lo que en bacterias aerobias se han desarrollado mecanismos de reparación de los centros Fe-S, como el sistema Isc (Gaupp *et al.*, 2012). Las rodanasas están involucradas en la detoxificación del cianuro en algunos microorganismos ya que estas enzimas catalizan la transferencia de azufre al cianuro produciendo tiocianato, un derivado del cianuro menos tóxico que el cianuro (Park y Ely, 2008). Sin embargo, en la cepa CECT5344 el gen que codifica la rodanasa no sólo está reprimido en condiciones limitantes de nitrógeno sino también en presencia de cianuro sódico, lo que sugiere su pérdida de funcionalidad en la detoxificación del cianuro en condiciones cianotróficas de crecimiento.

Entre los genes que incrementaron su expresión exclusivamente en cianuro sódico se encuentra el gen que codifica la 2-metilcitrato sintasa, una acil-CoA transferasa que utiliza oxalacetato y propionil-CoA como sustratos para producir 2-metilcitrato (Gerike *et al.*, 1998). Como se ha indicado, el oxalacetato se produce y acumula en el medio de cultivo en respuesta a cianuro (Estepa *et al.*, 2012), y probablemente la acumulación de este cetoácido es responsable de inducir otras enzimas que usan este compuesto como sustrato.

Por otro lado, un gran número de genes que codifican metaloenzimas son reprimidos por el cianuro y esto podría ser un efecto colateral de la inhibición enzimática causada por el cianuro, que muestra una gran afinidad por los centros metálicos. Varios genes que codifican transportadores de metales están inducidos en células cultivadas con residuo joyero. Los transportadores de sideróforos- Fe^{3+} son sistemas del tipo ABC o dependientes de TonB para la adquisición de hierro, permitiendo a la célula sobrevivir en presencia de cianuro (Crosa y Walsh, 2002). El residuo de la joyería contiene cianuro libre y unido a metales, metales como el hierro, cobre y zinc, y también pequeñas trazas (μM) de nitrito y cianato. Los sistemas de extrusión de metales se inducen como mecanismos de detoxificación en presencia de altas concentraciones de metales. Las bombas de transporte de metales en bacterias se pueden clasificar en tres tipos: familia facilitadora de la difusión de cationes (CDF) dependiente de gradiente químico (H^+ o K^+), ATPasas tipo P1 y las bombas RND (resistencia-nodulación-división celular), compuestas por una proteína de membrana externa, un componente periplásmico con una pequeña región hidrofóbica de membrana y un componente integral de membrana (Nies, 2003). Los genes que codifican varios tipos de transportadores de metales aparecen inducidos en células cultivadas con residuo joyero, incluyendo ATPasas tipo P para expulsión de Cu^+ o Cd^{2+} , bombas para multidroga de la familia RND y genes reguladores involucrados en los sistemas de detoxificación de metales. Aunque un gen que codifica una arseniato reductasa también está inducido por el residuo joyero, no se pudieron detectar en estos residuos industriales derivados del arsénico. Sin embargo, se ha descrito que otros metales pueden actuar como inductores de la arseniato reductasa (Park y Ely, 2008). El gen *zur* se encontró específicamente reprimido por el residuo de la joyería. Este gen codifica un regulador positivo de adquisición de hierro y zinc. Se ha demostrado previamente que la familia de proteínas reguladoras Zur reprimen genes involucrados en la adquisición de zinc en

Corynebacterium diphtheria en condiciones de alta concentración de zinc (Smith *et al.*, 2009).

Las ferritinas pueden participar en la protección contra el daño oxidativo al unirse al hierro, evitando la formación de radicales libres y de especies reactivas de oxígeno por la reacción de Fenton (Bellapadrona *et al.*, 2010). Además de participar en la homeostasis del hierro, recientemente se ha postulado un papel de la proteína Dps en la homeostasis del cobre en *E. coli*, donde los niveles de cobre intracelular decrecen cuando la proteína Dps está sobreexpresada (Thieme y Grass, 2010). El gen *dps* que codifica una ferritina de unión al DNA también está inducido por cianuro en *P. pseudoalcaligenes*. Para estudiar el papel de esta ferritina en el proceso de asimilación/degradación del cianuro en la cepa CECT5344, se construyó un mutante en el gen *dps*. El crecimiento del mutante Dps⁻ está afectado sólo en presencia de altas concentraciones de cobre con amonio como fuente de nitrógeno, mientras que el crecimiento de este mutante no se afecta en medios que contienen cianuro o en presencia de altas concentraciones de hierro (Luque-Almagro *et al.*, 2015). Estos resultados sugieren que la proteína Dps no interviene en la homeostasis de hierro durante la asimilación/destoxificación de cianuro, sino que podría participar en la defensa frente a la toxicidad mediada por el cobre.

Los genes *nas* involucrados en la asimilación nitrato/nitrito se indujeron en la cepa CECT5344 en respuesta al residuo de la joyería y a condiciones limitantes de nitrógeno. Es conocido que estos genes *nas* se inducen en condiciones limitantes de nitrógeno en una gran variedad de bacterias Gram negativas, normalmente a través del sistema regulador del nitrógeno NtrBC (Hervás *et al.*, 2008). Probablemente los genes de asimilación de nitrato se indujeron también en la cepa CECT5344 en respuesta al residuo joyero porque este residuo contiene trazas de nitrito (del orden de μM), que podría actuar como un inductor. También es interesante destacar que varios genes estructurales y reguladores del metabolismo de los polihidroalcanoatos, como el gen *phaI*, se indujeron en células cultivadas con el residuo joyero y en condiciones limitantes de nitrógeno. El gen *phaI* comparte agrupación génica con otros genes involucrados en el metabolismo de polihidroalcanoatos en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, una estirpe cuya capacidad de formar bioplásticos durante la degradación de cianuro ha sido recientemente descrita (Manso *et al.*, 2015). La producción de este importante biomaterial podría suponer un valor

añadido a la biorremediación de residuos industriales cianurados por *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

Entre los genes de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 inducidos en respuesta a cianuro sódico, residuo de la joyería y condiciones limitantes de nitrógeno, se incluyó el gen *nitC*, que codifica la nitrilasa NitC esencial para la asimilación de cianuro en la cepa CECT5344 (Estepa *et al.*, 2012), el gen de la GCN5-N-acetiltransferasa y otros genes de función desconocida que constituyen la agrupación génica *nit1C*. También se indujeron en células cultivadas en estas tres condiciones metabólicas, genes que codifican aminotransferasas dependientes de GntR-MocR y piridoxal fosfato (PLP), genes de síntesis y transporte de biotina y los genes que codifican el transportador de cianato tipo ABC (*cynABD*) y la cianasa (*cynS*) requeridos para la asimilación de cianato. Las proteínas GntR-MocR son reguladores transcripcionales que contienen un motivo hélice-giro-hélice (HTH) de unión al DNA y un dominio aminotransferasa. En proteínas tipo MocR se requiere PLP como cofactor para la capacidad aminotransferasa y reguladora, como se ha evidenciado para PdxR de *Streptomyces venezuelae*, una proteína directamente involucrada en la regulación de la síntesis de piridoxal fosfato (Rigali *et al.*, 2002). Hasta la fecha se desconoce el significado biológico de la relación entre cianuro, hambre de nitrógeno y las coenzimas PLP y biotina, evidenciada en este trabajo. El cianato y la asimilación/destoxificación del cianuro siguen rutas distintas en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, ya un mutante deficiente en el gen *cynS* de la cianasa puede usar cianuro como única fuente de nitrógeno igual que la cepa silvestre (Luque-Almagro *et al.*, 2008). Sin embargo, el cianuro y el cianato están indirectamente conectados, como demuestra la inducción de los genes del transportador de cianato y de la cianasa en medios que contienen cianuro. Se ha postulado que el cianuro bloquea la transferencia de electrones de la cadena respiratoria por la inhibición de la oxidasa terminal, y en consecuencia, se producen radicales libres y especies reactivas de oxígeno. La oxidación del cianuro por estas especies reactivas de oxígeno podrían provocar la formación de cianato (Sarla *et al.*, 2004). Como se ha comentado, el gen *nitC* de la nitrilasa se encontró inducido en células cultivadas en medios que contienen cianuro (NaCN y residuo joyero) y también en condiciones limitantes de nitrógeno. Más aún, el patrón de expresión del gen *nitC* fue similar al mostrado por los genes involucrados en la asimilación de otros componentes nitrogenados, tales como los genes *nas* (asimilación de

nitrato/nitrito) y los genes *gln/glt* (asimilación de amonio), lo que sugiere que el gen *nitC* funciona como parte de una ruta de asimilación de nitrilos orgánicos como fuente de nitrógeno. Por lo tanto, las condiciones de asimilación de cianuro pueden provocar respuestas similares a la limitación de nitrógeno, como ocurre cuando se utiliza nitrato y otras fuentes de nitrógeno alternativas (Silberbach *et al.*, 2005; Luque-Almagro *et al.*, 2007). Considerando otros genes que codifican nitrilasas, el gen *nit3* se indujo exclusivamente en cianuro sódico mientras que los genes *nit1* y *nit4* se indujeron tanto en cianuro sódico como en residuo joyero. El hecho de que estos genes de nitrilasas (*nit1*, *nit3* y *nit4*) no se indujeran en células de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 cultivadas en condiciones limitantes de nitrógeno, en contraste con el gen *nitC*, sugiere que estas tres nitrilasas participan en la detoxificación del cianuro más que en su asimilación. Aunque el estudio del entorno de un gen puede ser útil para predecir su posible función, este no es el caso de las nitrilasas *nit1* y *nit3*, ya que tienen en su entorno genes de función desconocida. Sin embargo, el gen *nit4* está en una agrupación junto a otros genes que se indujeron por cianuro sódico y residuo joyero, tales como el gen *cioB* para la respiración insensible a cianuro (Wibberg *et al.*, 2014). El gen *aguB* (BN5_0258) también codifica un miembro de la superfamilia nitrilasa/C-N hidrolasa, aunque no se incluye en la subfamilia nitrilasa (Podar *et al.*, 2005). Este gen se reprimió específicamente en células cultivadas con residuo joyero, por lo que podría ser sensible a los metales presentes en el mismo.

5.2. ANÁLISIS PROTEÓMICO Y MUTACIONAL DE LA LIMITACIÓN DE HIERRO Y LA RESPUESTA A CIANURO

El cianuro es un compuesto muy tóxico para la mayoría de los seres vivos, pudiendo causar también graves problemas ambientales (Luque-Almagro *et al.*, 2016). La toxicidad del cianuro es debida a que éste reacciona con cofactores enzimáticos metálicos, tales como Fe, Zn o Cu, formando complejos muy estables. Así, el cianuro es un inhibidor irreversible de la cadena respiratoria mitocondrial, donde reacciona específicamente con la forma oxidada de la oxidasa terminal *aa₃* (Mathews *et al.*, 2002; Christison y Rohrer, 2007).

El pH es un factor muy importante en la biodegradación de cianuro, ya que el alto pKa del ácido cianhídrico favorece la evaporación del cianuro a pH neutro, condiciones en las que la mayoría de organismos cianotrofos crecen. Sin embargo, *Pseudomonas*

Pseudoalcaligenes CECT5344 puede utilizar cianuro como única fuente de nitrógeno a pH 9,5 (Luque-Almagro *et al.*, 2005a,b). La degradación biológica de cianuro aprovecha la capacidad de ciertos microorganismos de utilizar compuestos cianurados como fuente de nitrógeno, convirtiendo un compuesto tóxico en una sustancia inocua. Estos microorganismos poseen diversos sistemas enzimáticos específicos que les permite desarrollarse en ambientes con alta concentración de cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2015a, b). *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 es una bacteria que resulta idónea para aplicaciones biotecnológicas en el tratamiento de residuos industriales cianurados, ya que no sólo asimila cianuro libre, sino también complejos cianuro-metálicos, cianato, nitrilos y otros derivados naturales o artificiales (Luque-Almagro *et al.*, 2005a).

Debido a la gran afinidad que presenta el cianuro por los metales, tradicionalmente se ha postulado que el cianuro podría provocar en el medio de cultivo una limitación de hierro y, por lo tanto, los microorganismos cianotrofos tendrían que responder a esta deficiencia mediante la inducción de mecanismos de captación de hierro de alta afinidad, como los sideróforos (Luque-Almagro *et al.*, 2005b; Huertas *et al.*, 2006). Para comprobar esta hipótesis, en este trabajo se ha realizado un análisis proteómico mediante 2D-PAGE, para estudiar la respuesta de la cepa CECT5344 a condiciones de limitación de hierro, tanto en presencia de quelantes como eliminando el hierro contenido en las trazas que se adicionan al medio de cultivo (Fig. 22, Tablas 18-20). Esta respuesta se ha comparado con el perfil proteómico de la cepa CECT5344 en presencia de cianuro, tanto a tiempos cortos de incubación (45 y 90 minutos) como a tiempos más largos (aproximadamente 8h), siendo estos últimos necesarios para que se lleve a cabo la asimilación de cianuro. Los microorganismos que crecen en condiciones de aerobiosis necesitan hierro para una gran variedad de funciones esenciales del metabolismo. Se estima que la concentración mínima de hierro necesaria para un óptimo crecimiento bacteriano es, aproximadamente, de 1 μM (Neilands, 1995). Sin embargo, la escasa disponibilidad de este metal hace que el hierro constituya un factor limitante en el crecimiento de la mayoría de los microorganismos. Las bacterias, y también algunos hongos, son capaces de sintetizar moléculas de gran afinidad por el hierro que se liberan al medio externo y que, gracias a su fuerza de unión al ión metálico, son capaces de formar complejos con el hierro. Estas moléculas se denominan sideróforos, y juegan un papel fundamental en la adquisición microbiana de hierro (Chen y

Kunz, 1997). La utilización de sideróforos como agentes quelantes de hierro es un proceso cíclico que se inicia con su ensamblaje en el citoplasma celular. Tras su secreción al medio externo, a través de transportadores específicos, la molécula entra en contacto con el átomo de hierro, dando lugar a la formación del complejo de coordinación con el ión Fe^{3+} (Boukhalifa y Crumbliss, 2002). En bacterias Gram-negativas, el complejo Fe^{3+} -sideróforo entra en el periplasma a través de receptores específicos localizados en la membrana externa. Este proceso está dirigido por el potencial de membrana citosólica y mediado por el sistema de transducción de energía TonB-ExbB-ExbD. Posteriormente, el complejo Fe^{3+} -sideróforo es transportado al citoplasma a través de sistemas de transporte dependientes de ATP de tipo ABC (Köster, 2001; Andrews *et al.*, 2003). Una vez en el interior celular el hierro es reducido a Fe^{+2} , lo que provoca su disociación del sideróforo, siendo este último reciclado y exportado nuevamente al exterior (Clarke *et al.*, 2001). De este modo se iniciaría un nuevo ciclo de captación, manteniendo un nivel de adquisición de hierro constante y sin necesidad de sintetizar nuevas moléculas (Ratledge y Dover, 2000).

La mayoría de las proteínas inducidas en respuesta a limitación de hierro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 que han sido identificadas en este trabajo mediante 2D-PAGE/MALDI-TOF, participan en la homeostasis de hierro (Fig. 21, Tablas 18 y 19). Entre estas se encuentra un receptor de sideróforos dependiente de TonB (FhuA), la proteína TonB y el componente periplásmico de un transportador de hierro de tipo ABC. Probablemente, la proteína de membrana externa OmpW identificada en el spot 9, codificada por el gen BN5_3662 aguas abajo del gen BN5_3661 que codifica la proteína TonB, también está relacionada con la homeostasis de hierro, aunque a diferencia de las anteriores esta se reprimió en condiciones limitantes de hierro (Tabla 18). La gran mayoría de las proteínas inducidas por escasez de hierro en la estirpe CECT5344 están codificadas por genes pertenecientes a agrupaciones génicas en cuya región promotora existe una caja Fur. Predicciones bioinformáticas realizadas en otros trabajos han identificado la secuencia consenso de la caja Fur en los sitios candidatos de unión a la proteína reguladora Fur, algunos de los cuales fueron analizados por ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA), transcripción *in vitro* (IVTA) y ensayo de titulación del represor Fur-FURTA (Quatrini *et al.*, 2007). Ensayos de FURTA en *E. coli* permitieron identificar un gran número de genes regulados por Fur e implicados en el transporte de hierro al interior

celular, incluyendo el transporte de los complejos de Fe^{3+} -sideróforo al periplasma a través de la membrana externa (Stojiljkovic *et al.*, 1994).

Cuando se comparó la respuesta, a nivel proteómico, de *P. pseudoalcaligenes* CECT53444 a escasez de hierro frente a la obtenida en presencia de cianuro en el medio de cultivo a tiempos cortos, no se encontró ninguna similitud (Tabla 20). Además, estos resultados se confirmaron también comparando las proteínas inducidas por limitación de hierro con aquellos genes que se encontraron inducidos por cianuro en el análisis transcriptómico mediante micromatrices de DNA (Tabla 19). Como se puede observar, la mayoría de genes que codifican proteínas inducidas en respuesta a limitación de hierro no se indujeron por NaCN. Sin embargo, algunos de estos genes sí se afectaron por el residuo cianurado o por condiciones de hambre de nitrógeno (Tabla 19). El residuo sí parece inducir condiciones de hambre de hierro, porque los genes de proteínas inducidas en ausencia de Fe son inducidos por el residuo, y la proteína OmpW en $-\text{Fe}$ también está reprimida por el residuo. Curiosamente a nivel proteómico no se ha visto antes esta respuesta en el residuo, quizás porque el hambre de hierro que causa el residuo no sea lo suficientemente fuerte para verlo a nivel de proteína, y sólo se detecta a nivel de expresión génica. En el caso del receptor de sideróforos FhuA, éste se encontró inducido en condiciones de deficiencia de hierro y en presencia del residuo cianurado, aunque no se indujo por cianuro sódico (Tabla 19). Posiblemente, este transportador de hierro pudiera tener un papel en el transporte de hierro en presencia del residuo de la joyería, que contiene altas concentraciones de hierro. Para profundizar en la función de FhuA, se procedió a generar una estirpe mutante *fhuA*⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Fig. 25). Al cultivar las estirpes silvestre y mutante *fhuA*⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con el quelante de hierro desferrioxamina, se observó que en estas condiciones, el mutante *fhuA*⁻ fue incapaz de crecer a diferencia de la estirpe silvestre (Fig. 26), demostrándose que FhuA es esencial para la adquisición de hierro cuando este metal se encuentra en concentraciones limitantes. En presencia de NaCN, el crecimiento del mutante respecto a la estirpe silvestre no se vio afectado, lo que confirma que el cianuro no genera condiciones limitantes de hierro (Fig. 27C,D). Sin embargo, el mutante *fhuA*⁻ creció peor con el residuo de la joyería que la estirpe silvestre (Fig. 27E), posiblemente por la deficiencia en la captación de hierro a través de este

transportador en estas condiciones, lo que confirma que el residuo crea condiciones de limitación de hierro.

En este trabajo también se ha intentado analizar la función de un transportador de hierro de tipo ABC mediante la construcción de una estirpe deficiente en el gen BN5_0248 (*orf3*), que codifica el componente periplásmico identificado mediante el análisis proteómico en respuesta a escasez de hierro (Tabla 19). Todos los intentos para obtener este mutante fueron infructuosos, ya que todas las colonias transconjugantes obtenidas fueron recombinantes simples. Es posible que el papel de este gen en la captación de hierro sea esencial para la supervivencia de la cepa CECT5344.

Por otro lado, para confirmar que en medios con cianuro las células de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 no experimentan una limitación de hierro, se determinó la concentración de hierro intracelular en células cultivadas en medios con cianuro y con otras fuentes de nitrógeno alternativas (Fig. 30). Así, se encontró que, independientemente de la presencia o ausencia de cianuro, la concentración de hierro intracelular disminuyó inicialmente. Sin embargo, a las 5 horas de añadir las distintas fuentes de nitrógeno se observó un aumento de la concentración intracelular de hierro sólo en los cultivos con cianuro (Fig. 30). Una posible explicación a estos resultados podría ser que el cianuro reacciona con el hierro en el medio de cultivo y que ambos sean transportados al interior celular conjuntamente, aunque no hay otras evidencias experimentales que apoyen esta hipótesis.

Si bien en estudios previos se ha analizado el proteoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en respuesta a cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2007) en este trabajo se quiso profundizar en dicho análisis realizando nuevos geles 2D-PAGE con la fracción soluble obtenida de la cepa CECT5344 cultivada en medios con cianuro o nitrato como fuente de nitrógeno (Fig. 31). Los resultados obtenidos confirmaron los estudios previos, identificándose proteínas inducidas por cianuro como la nitrilasa NitC y las proteínas de función desconocida NitB y NitG. Estas tres proteínas, codificadas en la agrupación génica *nit1C* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, son esenciales para la asimilación de cianuro (Estepa *et al.*, 2012). También se identificaron en este trabajo, confirmando resultados previos, la subunidad C de una alquil-hidroperóxido reductasa (AhpC) y una dihidrodipicolinato sintasa (DapA), ambos inducidas por cianuro. Para completar el estudio proteómico en respuesta a cianuro de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se ha realizado un

estudio proteómico adicional usando amonio como fuente de nitrógeno en lugar de nitrato (Fig. 32). En estas condiciones, además de las proteínas inducidas por cianuro descritas previamente, se ha identificado una nueva proteína inducida por cianuro, el componente periplásmico DctP1 de un transportador de ácidos dicarboxílicos de tipo TRAP.

En el análisis transcriptómico realizado en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 también se han encontrado inducidos por cianuro los genes pertenecientes a la agrupación génica *nitIC*. Los resultados transcriptómicos también confirmaron la inducción de la proteína AhpC, pero la inducción de las proteínas DapA y DctP1 a nivel proteómico no se correspondió con los resultados transcriptómicos, ya que el gen *dapA* sólo se indujo en condiciones de limitación de nitrógeno y el gen *dctP1* no se vió afectado por ninguna de las condiciones estudiadas en el análisis transcriptómico (Tabla 22).

A pesar de la no correspondencia entre los datos transcriptómicos y proteómicos del transportador DctP1, se procedió a estudiar su posible implicación en la asimilación de cianuro generando un mutante de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 deficiente en dicho transportador (Fig. 34). Su caracterización con distintas fuentes de carbono que contienen entre 3 y 6 átomos de carbono, y amonio como fuente de nitrógeno, reveló que este transportador DctP1 tiene un papel en el transporte de ácidos dicarboxílicos del tipo C4, ya que el mutante *dctP1*⁻ mostró un crecimiento inferior que la estirpe silvestre cuando se utilizó succinato, fumarato, malato o aspartato como fuente de carbono (Fig. 36). En condiciones aeróbicas, los sustratos sirven como fuente de carbono y energía y se oxidan hasta CO₂ en el ciclo del ácido cítrico. Este metabolismo requiere de sistemas que capten los ácidos dicarboxílicos C4 (Ullmann *et al.*, 2000). El malato y el aspartato pueden ser fácilmente convertidos en fumarato por deshidratación o desaminación y son usados como aceptores de electrones en la respiración del fumarato. El succinato producido en esta respiración es excretado por un sistema antiporte con el fumarato (o el malato y aspartato). Las bacterias inducen el metabolismo de los ácidos dicarboxílicos C4 sólo en presencia de estos sustratos en el medio externo, activándose las enzimas encargadas de su metabolismo en respuesta a la señal recibida. Los transportadores de ácidos dicarboxílicos del tipo C4 se clasifican en las familias de los transportadores DctA, DcuABC, CitT y los transportadores periplásmicos independientes de ATP del tipo TRAP. Los transportadores DctA están presentes en un gran número de bacterias aerobias y

utilizan un sistema simporte dicarboxilato/cación (Davies *et al.*, 1999). DcuABC está presente en bacterias anaerobias y puede transportar dicarboxilatos C_4 en ambos sentidos (Rabus, 1999). CitT se encarga del intercambio citrato/succinato en la respiración anaerobia y también puede transportar ácidos tricarbónicos. La familia TRAP incluye transportadores secundarios compuestos por dos proteínas integrales transmembrana y una proteína periplásmica de unión al sustrato (Kelly y Thomas, 2001). Los transportadores TRAP mejor conocidos son los de la bacteria fotosintética *Rhodobacter capsulatus* (Forward *et al.*, 1997), siendo específicos para dicarboxilatos C_4 . En *Rhodobacter sphaeroides* son específicos para el transporte de glutamato (Jacobs *et al.*, 1996). El mutante $dctP1^-$ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 mostró una producción y acumulación en el sobrenadante de α -cetoácidos diferente a la mostrada por la estirpe silvestre, y esto puede influir en la pequeña diferencia en el consumo de cianuro detectada, que fue siempre ligeramente superior en la estirpe silvestre (Fig. 37). Ya que la estirpe $dctP1^-$ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 estaba parcialmente afectada en el consumo de cianuro, se procedió a realizar un mutante en un gen homólogo a $dctP1$, el gen $dctP2$ (Fig. 39). Sin embargo, la caracterización fisiológica en medios con cianuro del mutante simple $dctP2Q2^-$ y del mutante doble $dctP1^-/dctP2Q2$ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 reveló que el componente DctP2 no participa en la asimilación de cianuro (Figs. 40 y 41). El papel que pueda desempeñar el transportador de ácidos dicarbónicos DctP1 en la asimilación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 podría estar relacionado con el transporte de α -cetoácidos, que al reaccionar con el cianuro formarían sus respectivas cianhidrinas para ser asimilados por la estirpe CECT5344.

La dihidrodipicolinato sintasa DapA, otra de las proteínas inducidas por cianuro a nivel proteómico (Tablas 23 y 24), es una enzima que participa en el primer paso de la biosíntesis de lisina, un aminoácido esencial en bacterias (Maringanti e Imlay, 1999). El análisis filogenético de la secuencia de la proteína DapA de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 reveló que esta proteína presenta homología con proteínas de β -proteobacterias, pero sólo con una estirpe de *Pseudomonas* (Fig. 43). *Diaphorobacter* sp. J5-51 fue el organismo con un homólogo más cercano a la proteína DapA de la estirpe CECT5344. La ausencia de homólogos en el género *Pseudomonas* sugiere que el gen $dapA$ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 podría haber sido adquirido por transferencia horizontal. En el entorno génico del gen $dapA$ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Fig. 42) se encuentran otros genes que

también se han encontrado inducidos por cianuro en las micromatrices de DNA (Tabla 17), entre los que cabe destacar el gen *nit4* que codifica una nitrilasa de β -cianoalanina que podría tener también un papel en la degradación de cianuro en la cepa CECT5344. En el caso de la alquil-hidroperóxido reductasa *AhpC*, esta proteína está implicada en la destoxificación de peróxidos orgánicos. Aunque el hierro es un metal indispensable, en condiciones aeróbicas una alta concentración en el medio puede resultar tóxica para la bacteria, debido a que el metal favorece la producción de especies reactivas de oxígeno a través de la reacción de Fenton, produciendo estrés oxidativo. El cianuro acelera la reacción de Fenton al bloquear la respiración y aumenta el potencial reductor de Fe^{3+} por la sideróforo reductasa *Fre* (Woodmansee e Imlay, 2002). Por este motivo, la célula debe mantener un estricto control de los niveles intracelulares de hierro, de tal manera que si son suficientes para cubrir los requerimientos de la célula, se reprimen los sistemas de captación del metal y se promueve su almacenamiento y utilización. El análisis filogenético de la proteína *AhpC* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 reveló que esta proteína si presenta homólogos en otras especies de *Pseudomonas*, como *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* o *P. mendocina*.

En la mayoría de las bacterias, la lisina es sintetizada a partir de aspartato, siguiendo una ruta enzimática que consta de nueve pasos. Esta ruta difiere de otras rutas de obtención de aminoácidos en que uno de los intermediarios, el diaminopimelato, es esencial para la fabricación de la pared celular de peptidoglicanos en gran negativas. Para asegurar la obtención del mismo, el control de esta ruta es mucho más complejo, y presenta rutas alternativas y compartidas para la síntesis de diferentes aminoácidos, como es el caso de la treonina y la metionina. En *Bacillus subtilis*, la regulación de la ruta de biosíntesis de diaminopimelato/lisina se realiza por isoenzimas asparto quinasas sensibles a la lisina y al diaminopimelato. Así, si hay exceso de lisina o diaminopimelato en el medio, la ruta de biosíntesis se encuentra reprimida (Rosner y Paulus, 1971; Moir y Paulus, 1977; Graves y Switzer 1990; Zhang y Paulus, 1990). Por otro lado, se ha descrito que un incremento de dipicolinato como consecuencia de su sobreproducción o de la inhibición de su degradación, recupera el fenotipo de un mutante de *E. coli* afectado en la superóxido dismutasa (Maringanti e Imlay, 1999). Los autores de este trabajo establecen como hipótesis, según sus resultados, que el dipicolinato quela el hierro reducido que se libera de los centros

sulfo-férricos atacados por especies reactivas de oxígeno, facilitando el reensamblaje de estos centros en sus metaloproteínas correspondientes. Para elucidar el papel de DapA y AhpC de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en el metabolismo del cianuro y su posible relación con la homeostasis de hierro y el estrés oxidativo, se han generado las estirpes mutantes *dapA*⁻ (Fig. 46) y *ahpC*⁻ (Fig. 47). Estas estirpes mutantes *dapA*⁻ y *ahpC*⁻ crecen peor cuando hay limitación de hierro (Fig. 48) y además presentan un crecimiento menor que la estirpe silvestre en medios con cianuro, ya sea cianuro sódico o residuo joyero (Fig. 49). La inducción de DapA observada en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en presencia de cianuro podría ser un mecanismo de resistencia para activar los centros sulfoférricos inactivados por el cianuro. Este mecanismo estaría mediado por un incremento del quelante dihidrodipicolinato, aunque en este trabajo no se ha determinado la presencia de este compuesto en condiciones de cianotrofia. A pesar de que DapA podría conferir resistencia a cianuro en la estirpe CECT5344, la ausencia de esta proteína en otra estirpe que asimila cianuro, *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764, indica que este no es un mecanismo general en la cianotrofia.

Por otro lado, en condiciones normales la concentración intracelular de las especies reactivas de oxígeno (ROS) se encuentra por debajo de los niveles tóxicos debido a que la célula posee actividades enzimáticas que se encargan de eliminar estas ROS. Entre los genes implicados en los mecanismos de destoxificación de las ROS y de reparación del DNA cabe destacar el gen *katB*, que codifica la catalasa, el gen *sod*, que codifica la superóxido dismutasa, y los genes *ahpCF*, que codifican la alquil-hidroperóxido reductasa (Quesada-Gómez, 2008). Las alquil-hidroperóxido reductasas (AhpCF) son las enzimas responsables del metabolismo de peróxidos orgánicos mejor caracterizadas en bacterias. AhpCF está formada por la subunidad catalítica AhpC, de 22 kDa, y una subunidad AhpF, con actividad reductasa de 52 kDa (Storz *et al.*, 1989; Poole y Ellis, 1996). El gen *ahpC* se ha conservado evolutivamente, estando presente tanto en bacterias como en humanos. La mutación del gen *ahpC* en bacterias incrementa la sensibilidad a peróxidos orgánicos, llegando a producir mutagénesis espontánea e incluso la muerte celular (Antelmann *et al.*, 1996). Además, estos mutantes deficientes en el gen *ahpC* muestran una alteración adicional inesperada, su hiperresistencia al H₂O₂ (Bsat *et al.*, 1996). El análisis de algunas enzimas implicadas en la destoxificación de peróxidos en estirpes mutantes *ahpC*⁻ reveló la sobreexpresión de la actividad catalasa, fundamentalmente debido a la catalasa monofuncional Kat1, y en menor

medida a la catalasa-peroxidasa bifuncional. El incremento de la actividad catalasa es una respuesta compensatoria a la pérdida del gen *ahpC*, la cual está regulada a través de un complejo mecanismo. El incremento de la actividad Kat1 está mediada por OxyR, ya que mutantes en el gen *oxyR* no presentan esta hiperresistencia (Mongkolsuk y Helmann, 2002). Sin embargo, la respuesta compensatoria por el incremento de la actividad catalasa-peroxidasa bifuncional está mediada por un regulador desconocido, independiente de OxyR. El gen *ahpC* tiene una única forma de regulación, en la que la forma reducida de OxyR reprime la expresión de *ahpC*, mientras que la forma oxidada de OxyR activa su expresión. OxyR es un regulador transcripcional que sensa H₂O₂ y peróxidos orgánicos (Storz *et al.*, 1989). Este papel de OxyR se ha estudiado en los géneros bacterianos *Xanthomonas* y *B. subtilis* (Mongkolsuk y Helmann, 2002). La presencia de H₂O₂ activa a OxyR, y éste a su vez activa la inducción de los genes *kat1* y *ahpC*. La ausencia del gen *ahpC* produce una sobreexpresión del gen *kat1* para intentar compensar su pérdida, lo que explica la hiperresistencia al H₂O₂ de estas estirpes mutantes. En el caso de la estirpe mutante *ahpC*⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, su menor crecimiento en presencia de cianuro puede ser explicado por el aumento de especies reactivas de oxígeno generadas en la cadena de transporte electrónico como consecuencia de la inhibición de la oxidasa terminal *aa*₃ (Quesada *et al.*, 2007). Como se ha descrito en otros estudios previos, el mutante *ahpC*⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 también mostró una hiperresistencia frente a peróxido de hidrógeno, en comparación con la estirpe silvestre, en medios con amonio (Figs. 50 y 51). La mayor actividad catalasa que presentó el mutante en medios con amonio y H₂O₂ confirmó que la sobreexpresión de esta actividad catalasa era también el mecanismo compensatorio en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en ausencia de AhpC (Fig. 52). Según este mecanismo compensatorio que confiere hiperresistencia a estrés oxidativo, el mutante *ahpC*⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 debería ser menos sensible al estrés oxidativo generado por el cianuro que la estirpe silvestre, por lo que este debería ser más resistente a cianuro. Sin embargo, este fenotipo esperado no fue el que se observó (Fig. 53), probablemente debido a que las catalasas son metaloenzimas que también son inhibidas por el cianuro, por lo que el mecanismo compensatorio de la ausencia de AhpC en medios con cianuro no sería funcional.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido establecer las siguientes conclusiones:

1. El análisis transcriptómico realizado en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 ha revelado que el cianuro afecta a la expresión de un 20% de los genes, mientras que las condiciones de hambre de nitrógeno ejercen un efecto más drástico sobre el transcriptoma, alterándose un 35% de los genes. Este análisis también ha permitido establecer que la cianotrofia y el hambre de nitrógeno son situaciones metabólicas diferentes, aunque ambas condiciones comparten genes inducidos y reprimidos.
2. El efecto del cianuro sobre el transcriptoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 incluye, además de la inducción de la resistencia y asimilación de este compuesto, la expresión de otros genes relacionados con la homeostasis de hierro y con los mecanismos de defensa frente a material genético exógeno.
3. El análisis proteómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en respuesta a limitación de hierro y a cianuro, así como los datos obtenidos del transcriptoma de esta estirpe en condiciones de cianotrofia, indican que el cianuro no afecta negativamente a la biodisponibilidad de este metal.

El análisis mutacional de los genes que codifican la dihidrodipicolinato sintasa (DapA) y la alquil hidroperóxido reductasa (AhpC) revela que estas proteínas son importantes para la degradación de cianuro.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Qare AW, Abou-Donia MB (2002). Sarin: health effects, metabolism, and methods of analysis. *Food Chem Toxicol*, 40:1327-33.
- Adjei MD, Ohta Y (2000). Factors affecting the biodegradation of cyanide by *Burkholderia cepacia* strain C-3. *J Biosci Bioengineer*, 89:274-277.
- Akcil A (2003). Destruction of cyanide in gold mill effluents: biological versus chemical treatments. *Biotechnol Adv*, 21:501-511.
- Akcil A, Mudder T (2003). Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: process review. *Biotechnol Lett*, 25:445-50.
- Akcil A, Karahan AG, Ciftci H, Saccig O (2003). Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (*Pseudomonas sp.*). *Miner Engineer*, p. 643-649.
- Alexander M (1999). *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, London.
- Al-Kindi S, Abed RM (2016). Effect of Biostimulation Using Sewage Sludge, Soybean Meal, and Wheat Straw on Oil Degradation and Bacterial Community Composition in a Contaminated Desert Soil. *Front Microbiol*, 4:7:240.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. *Nucleic Acids Res*, 25:3389-3402.
- Alvarez R, Ordóñez A, Loredó J, Younger PL (2013). Wetland-based passive treatment systems for gold ore processing effluents containing residual cyanide, metals and nitrogen species. *Environ Sci Proc Imp*, 15:2115-2124.
- Amabile-Cuevas CF, Demple B (1991). Molecular characterization of the *soxRS* genes of *Escherichia coli*: two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic Acids Res*, 19:4479-4484.
- Andrews S (1998). Iron storage in bacteria. *Advan Microb Physiol*, 40:281-351.

- Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones F (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev*, 27:215-237.
- Antelmann H, Engelmann S, Schmid R, Hecker M (1996). General and oxidative stress responses in *Bacillus subtilis*: cloning, expression, and mutation of the alkyl hydroperoxide reductase operon, *J Bacteriol*, 178:6571-8.
- Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H (2000) Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonads* based on 16S rRNA sequence. *Intern J Syst Evol Microbiol*, 50:1563-1589.
- Askeland RA, Morrison SM (1983). Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 45:1802-1807.
- Asmus E, Garschagen H (1953). The use of barbituric acid for the photometric determination of cyanide and thiocyanate. *Z Anal Chem*, 138:414-422.
- Atlas RM, Unterman R (1999). Bioremediation. En: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. ASM Press, Washington D.C.
- Babu GRV, Wolfram JH, Chapatwala KD (1992). Conversion of sodium cyanide to carbon dioxide and ammonia by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *J Ind Microbiol*, 9:235-238.
- Barbusiński K (2009). Fenton reaction. Controversy concerning the chemistry. *Ecol Chem Engin*, 16:347-358.
- Bartosz D, Browski ZA, Janczarek M, Hupka J, Miller JD (2002). Photo-oxidation of dissolved cyanide using TiO₂ catalyst. *J Photo Photobiol Chem*, 151:201-205.
- Becker A, Schmidt M, Jäger W, Pühler A (1995). New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene*, 162:37-39.
- Beckman JS (1996). Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxyxynitrite. *Chem Res Toxicol*, 9:836-844.

- Bellapadrone G, Ardini M, Ceci P, Stefanini S, Chiancone E (2010). Dps proteins prevent Fenton-mediated oxidative damage by trapping hydroxyl radicals within the protein shell. *Free Rad Biol Med* 48, 292-297.
- Bereswill S, Greiner S, van Vliet AH, Waidner B, Fassbinder F, Schiltz E, Kusters JG, Ist M. (2000). Regulation of ferritin-mediated cytoplasmic iron storage by the ferric uptake regulator homolog (Fur) of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, 182:5948-5953.
- Bhattacharya R, Pant SC, Kumar D, Dube SN (2006). Toxicity evaluation of two treatment regimens for cyanide poisoning. *J Applied Toxicol*, 15:439-441.
- Borchers R (1977). Allantoin determination. *Anal Biochem*, 79:612-613.
- Botz M, Mudder T, Akcil A (2005). *Advances in Gold Ore Processing*. Ed. M. Adams, Elsevier Ltd., Amsterdam.
- Boukhalifa H, Crumbliss A (2002). Chemical aspects of siderophore mediated iron. *Biometals Rev*, 15:325-39.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-256.
- Brim H, McFarlan SC, Fredrickson JK, Minton KW, Zhai M, Wackett LP, Daly MJ (2000). Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nat Biotechnol*, 18:85.
- Bsat N, Chen L, Helmann J (1996). Mutation of the *Bacillus subtilis* alkyl hydroperoxide reductase (*ahpCF*) operon reveals compensatory interactions among hydrogen peroxide stress genes. *J Bacteriol*, 178:6579-6586.
- Burlina A (1985). *Methods of enzymatic analysis*, Vol. VII, 3ª edición.
- Campbell SC, Olson GJ, Clark TR, McFeters G (2001). Biogenic production of cyanide and its application to gold recovery. *J Indus Microbiol Biotechnol*, 26:134-139

- Campos MG, Pereira P, Roseiro JC (2006). Packed-bed reactor for the integrated biodegradation of cyanide and formamide by immobilised *Fusarium oxysporum* CCM1 876 and *Methylobacterium* sp. RXM CCM1. *Enz Microbiol Technol Elsevier*, 23:312-125.
- Cartron ML, Maddocks S, Gillingham P, Craven CJ, Andrews SC (2006). Transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals*, 19:143-157.
- Castillo F, Roldán MD, Blasco R, Huertas MJ, Caballero FJ, Moreno-Vivián C, Martínez-Luque M (2005). *Biología Ambiental*. Tébar. ISBN: 8473602110.
- Castric PA, Strobel GA (1969). Cyanide metabolism by *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem* 244:4089-4094.
- Cecinato A, Balducci C, Mastroianni D (2012). Sampling and analytical methods for assessing the levels of organic pollutants in the atmosphere: PAH, phthalates and psychotropic substances: a short review. *Environ Sci Pollut Res Int*, 19:1915-26.
- Chander M, Dimple B (2004). Functional analysis of SoxR residues affecting transduction of oxidative stress signals into gene expression. *J Biol Chem*, 279:41603-41610.
- Chapatwala KD, Babu GRV, Vijaya OK, Kumar KP, Wolfram JH (1998). Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *J Indus Microbiol Biotechnol*, 20:28-33.
- Chen JL, Kunz DA (1997). Cyanide utilization in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 involves a putative siderophore, *FEMS Microbiol Lett*, 156:61.
- Chenault S.S. y Earhart C.F. (1991) Organization of genes encoding membrane proteins of the *Escherichia coli* ferrienterobactin permease. *Mol Microbiol*, 5:1405-1413.
- Christison TT, Rohrer JS (2007). Direct determination of free cyanide in drinking water by ion chromatography with pulsed amperometric detection. *J Chromatogr*, 7:31-39.
- Clarke TE, Tari LW, Vogel HJ (2001). Structural biology of bacterial iron uptake systems. *Curr Top Med Chem*, 1:7-30.

- Crosa J (1997). Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61:319-336.
- Crosa JH, Walsh CT (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis. *Microbiol. Mol Biol Rev* 66, 223-249.
- Czapski G (1984). Reaction of $\cdot\text{OH}$. *Methods Enzymol*, 105:209-215.
- Dash RR, Gaur A, Balomajumder C, (2009). Cyanide in industrial wastewaters and its removal: a review on biotreatment. *J Hazard Mater*, 163:1-11.
- Davies SJ, Golby P, Omrani D, Broad SA, Harrington VL, Guest JR, Kelly DJ, Andrews SC (1999). Inactivation and regulation of the aerobic C(4)-dicarboxylate transport (*dctA*) gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 181:5624-35.
- Dean A, Maria Grazia Ferlin, Paola Brun, Ignazio Castagliuolo, Robert A. Yokel, Alfonso Venzo, G. Giorgio Bombi, Valerio B. Di Marco (2011). Evaluation of 4-hydroxy-6-methyl-3-pyridinecarboxylic acid and 2,6-dimethyl-4-hydroxy-3-pyridinecarboxylic acid as chelating agents for iron and aluminium. *Inorg Chim*, 11:179-186.
- Delany I, Rappuoli R, Scarlato V (2004). Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*, 52:1081-1090.
- di Tomaso G, Fedi S, Carnevali M, Manegatti M, Taddei C, Zannoni D (2002). The membrane-bound respiratory chain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 cells grown in the presence or absence of potassium tellurite. *Microbiology*, 148:1699-1708.
- Ding H, Hidalgo E, Demple B (1996). The redox state of the [2Fe-2S] clusters in SoxR protein regulates its activity as a transcription factor. *J Biol Chem*, 271:33173-33175.
- Donato D, Nichols O, Possinghamc H, Moore M, Ricci PF, Noller BN (2007). A critical review of the effects of gold cyanide-bearing tailings solutions on wildlife. *Environ Intern*, 33:974-984.

- Dubey SK, Holmes DS (1995). Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol*, 11:257.
- Dubrac S, Touati D (2000). Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *J Bacteriol*, 182:3802-3808.
- Dumestre A, Chone T, Portal JM, Gerard M, Berthelin J (1997). Cyanide degradation under alkaline conditions by a strain of *Fusarium solani* isolated from contaminated soils. *App Environ Microbiol*, 63:2729-2734.
- Dursun AY, Aksu Z (2000). Biodegradation kinetics of ferrous (II) cyanide complex ions by immobilized *Pseudomonas fluorescens* in a packed bed column reactor. *Proc Biochem*, 35:615-622.
- Dursun AY, Calik A, Aksu Z (1999). Degradation of ferrous (II) cyanide complex ions by *Pseudomonas fluorescens*. *Proc Biochem*, 34:901.
- Dzombak DA, Rajat S, Ghosh GM, Wong-Chong GM (2006). Cyanide in water and soil - Chemistry, Risk, and Management. *CRC Press*, 8:237-308.
- Ebbs S (2004). Biological degradation of cyanide compounds. *Environ Biotechnol*, 15:231-236.
- Eick-Helmerich K, Braun V (1989). Import of biopolymers into *Escherichia coli* nucleotide sequences of the *exbB* and *exbD* genes are homologous to those of the *tolQ* and *tolR* genes, respectively. *J Bacteriol*, 171:5117-5126.
- Eisler R (2004). Mercury hazards from gold mining to humans, plants, and animals. *Rev Environ Contam Toxicol*, 181:139-98.
- Ernst FD, Bereswill S, Waidner B, Stoof J, Mäder U, Kusters JG, Kuipers EJ, Kist M, van Vliet AHM, Homuth G (2005a). Transcriptional profiling of *Helicobacter pylori* Fur- and iron-regulated gene expression. *Microbiology*, 151: 533-546.
- Ernst FD, Homuth G, Stoof J, Mäder U, Waidner B, Kuipers EJ, Kist M, Kusters JG, Bereswill S, van Vliet AHM (2005b). Iron-responsive regulation of the *Helicobacter*

- pylori* iron-cofactored superoxide dismutase SodB is mediated by Fur. *J Bacteriol*, 187:3687-3692.
- Esclapez J, Pire C, Camacho M, Bautista V, Martínez-Espinosa RM, Zafrilla B, Vegara A, Alcaraz LA, Bonete MJ (2015). Transcriptional profiles of *Haloferax mediterranei* based on nitrogen availability. *J Biotechnol* 193:100-107.
- Estepa J, Luque-Almagro VM, Manso I, Escribano MP, Martínez-Luque M, Castillo F, Moreno-Vivián C, Roldán MD (2012). The *nit1C* gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 involved in assimilation of nitriles is essential for growth on cyanide. *Environ Microbiol Rep*, 4:326-324.
- Eweis JB, Ergas SJ, Chang DPV, Schroeder ED (1999). Principios de biorrecuperación. McGrawHill, Madrid.
- Ezzi-Mufaddal I, Lynch JM (2002). Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma spp.* *Enz Microbiol Technol*, 31:1042.
- Farr SB, D'Ari R, Touati D (1986). Oxygen-dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:8268-8272.
- Fecker L, Braun V (1983). Cloning and expression of the *fhu* genes involved in iron(III)-hydroxamate uptake by *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 156:1301-1314.
- Figueira MM, Ciminelli VS, De Andrade MC, Linardi VR (1996). Cyanide degradation by an *Escherichia coli* strain. *Can J Microbiol*, 42:519-23.
- Flint DH, Tuminello JF, Emptage MH (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem*, 268:22369-22376.
- Forward J A, M C Behrendt, N R Wyborn, R Cross, D J Kelly (1997). TRAP transporters: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the *dctPQM* genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria. *J Bacteriol*, 17:5482-5493

- Friedman YE, O'Brian MR (2004). The ferric uptake regulator (Fur) protein from *Bradyrhizobium japonicum* is an iron-responsive transcriptional repressor in vitro. *J Biol Chem*, 279:32100-32105.
- Fry WE, Millar RL (1972). Cyanide degradation by an enzyme from *Stemphylium loti*. *Arch Biochem Biophys*, 151:468-474.
- Gaudu P, Weiss B (1996). SoxR, a [2Fe-2S] transcription factor, is active only in its oxidized form. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:10094-10098.
- Gaupp R, Ledala N, Somerville GA (2012). Staphylococcal response to oxidative stress. *Front Cell Inf Microbiol*. 2:33.
- Gerike U, Hough DW, Russell NJ, Dyall-Smith ML, Danson MJ (1998). Citrate synthase and 2-methylcitrate synthase: structural, functional and evolutionary relationships. *Microbiology*, 144:929-935.
- Gilden RC, Huffling K, Sattler B (2010). Pesticides and health risks. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*, 39:103-10.
- Glazer AN, Nikaido H (1995). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Godelier M (1974). *Antropología y Biología. Hacia una nueva cooperación*. Anagrama. Barcelona.
- Goncalves MMM, Pinto AF, Granato M (1998). Biodegradation of free cyanide, thiocyanate and metal complexed cyanides in solutions with different compositions. *EnvironTechnol*, 19:133-142.
- Goto M (1983). *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* subsp. nov., the Causal Agent of Bacterial Leaf Blight of Konjac (*Amorphophalus konjaci* Koch.) *Int J Syst Evol Microbiol*, 33:539-545.
- Graves LM, Switzer RL (1990). Aspartokinase III, a new isozyme in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 96:349-67.

- Grishin NV (1995). Estimation of the number of amino acid substitutions per site when the substitution rate varies among sites. *J Mol Evol*, 41:675-9.
- Gupta N, Balomajumder C, Agarwal VK (2010). Enzymatic Mechanism and Biochemistry for Cyanide Degradation: A Review. *J Hazard Mater*, 176:1-13.
- Gutiérrez P, Michael YL, Osborne J, Pomerantseva E, Liu Q, Gehring K (2005). Solution structure of the carbon storage regulator protein CsrA from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 187:496-3501.
- Hansberg W (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Instituto de Fisiología Celular*, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hantke K (1981). Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: Isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet*, p 288-292.
- Hantke K (1990). Dihydroxybenzoylserine a siderophore for *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 55:5-8.
- Hantke K (2003). Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? *Trends Microbiol*, 11:192-195.
- Heider J, Spormann AM, Beller HR, Widdel F (1999). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev*, Vol. 22, Issue 5, pp. 459-473.
- Heidrich C, Hantke K, Bierbaum G, Sahl HG (1996). Identification and analysis of a gene encoding a Fur-like protein of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett*, 140:253-259.
- Heras MC (1995). Quelantes del hierro: situación actual y perspectivas terapéuticas. *Farm Hosp*, 19:323-329.
- Herbig AF, Helmann JD (2001). Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol Microbiol*, 41:849-859.

- Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistant selection markers for cloning a stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol*, 172:6557-6567.
- Hervás AB, Canosa I, Santero E (2008). Transcriptome analysis of *Pseudomonas putida* in response to nitrogen availability. *J Bacteriol*, 190:416-420.
- Hidalgo E, Bollinger JM, Bradley TM, Walsh CT, Dimple B (1995). Binuclear [2Fe-2S] clusters in the *Escherichia coli* SoxR protein and role of the metal centers in transcription. *J Biol Chem*, 270:20908-20914.
- Huertas MJ, Luque-Almagro VM, Martínez-Luque M, Blasco R, Moreno-Vivián C, Castillo F, Roldán MD (2006). Cyanide metabolism of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: role of siderophores. *Biochem Soc Trans*, 34:152-155.
- Huertas MJ, Sáez LP, Roldán MD, Luque-Almagro VM, Martínez-Luque M, Blasco R, Castillo F, Moreno-Vivián C, García-García I (2010). Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor. Influence of pH. *J Hazard Mat*, 179:72-78.
- Imlay JA, Linn S (1987). Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J Bacteriol*, 169:2967-76.
- Imlay JA (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol*, 57:395-418.
- Jacobs MH, van der Heide T, Driessen AJ, Konings WN (1996). Glutamate transport in *Rhodobacter sphaeroides* is mediated by a novel binding protein-dependent secondary transport system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:12786-90.
- Jarmer H, Berka R, Knudsen S, Saxild HH (2002). Transcriptome analysis documents induced competence of *Bacillus subtilis* during nitrogen limiting conditions. *FEMS Microbiol Lett*, 206:197-200.
- Jiménez JI, Miñambres B, García JL, Díaz E (2004). Genomic insights in the metabolism of aromatic compounds in *Pseudomonas*. En: *Pseudomonas*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 425-462

- Jünemann S (1997). Cytochrome *bd* terminal oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1321:107-127.
- Kao CM, Liu JK, Lou HR, Lin CS, Chen SC (2003). Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere*, 50:1055-1061.
- Kao CM, Chen KF, Liu JK, Chou SM, Chen SC (2006). Enzymatic degradation of nitriles by *Klebsiella oxytoca*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71:228-33.
- Kehres DG, Janakiraman A, Slauch JM, Maguire ME (2002). Regulation of *Salmonella enterica serovar Typhimurium mntH* transcription by H₂O₂, Fe²⁺, and Mn²⁺. *J Bacteriol*, 184:3151-3158.
- Kelly DJ, Thomas GH (2001). The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev*, 25:405-24.
- Knowles CJ (1988). Cyanide utilization and degradation by microorganisms. *Ciba Foundation Symposium*, 140:3-15.
- Koo MS, Lee JH, Rah SY, Yeo WS, Lee JW, Lee KL, Koh YS, Kang SO, Roe JH (2003). A reducing system of the superoxide sensor SoxR in *Escherichia coli*. *Embo J*, 22:2614-2622.
- Köster W. (2001). ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res Microbiol*, 152:291-301.
- Kuhn DD, Young TC (2005). Photolytic degradation of hexacyanoferrate (II) in aqueous media: The determination of the degradation kinetics. *Chemosphere*, 60:1222-1230.
- Kunz DA, Chen JL, Guangliang P (1998). Accumulation of α -Keto Acids as Essential Components in Cyanide Assimilation by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *Appl Environ Microbiol*, 64:4452-4459.
- Kunz RG, Casey JP (1980). Environmental Management Handbook for the Hydrocarbon Processing Industries. *Gulf Publishing Co.*, Houston.
- Kwon HK, Woo SH, Park JM (2002). Thiocyanate degradation by *Acremonium strictum* and inhibition by secondary toxicants. *Biotech Lett*, 24:1347.

- Ledala N, Pearson SL, Wilkinson BJ, Jayaswal RK (2007). Molecular characterization of the Fur protein of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*, 153:1103-1111.
- Lee C, Lee SM, Mukhopadhyay P, Kim SJ, Lee SC, Ahn WS, Yu MH, Storz G, Ryu SE (2004). Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nat Struct Mol Biol*, 11:1179-1185.
- Levefaudes M, Patin D, de Sousa-d'Auria C, Chami M, Blanot D, Hervé M, Arthur M, Houssin C, Mengin-Lecreulx D (2015). Diaminopimelic acid amidation in corynebacteriales: new insights into its role in peptidoglycan modification. *J Biol Chem*, 290:13079-94.
- Liu H, Dong C, Zhao T, Han J, Wang T, Wen X, Huang Q (2016). Functional analysis of the ferric uptake regulator gene fur in *Xanthomonas vesicatoria*. *PLoS One*, 11:e0149280.
- Logsdon M, Kagelstein K, Mudder, F (2006). El manejo del cianuro en la extracción del oro. *Concejo Internacional de Metales y Medio Ambiente. USA*.
- Lovley, DR (2003). Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nat Rev Microbiol*, 1:35-44.
- Luque-Almagro V (2005). Metabolismo del cianuro y del cianato en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Aplicaciones biotecnológicas. *Tesis doctoral*. Universidad de Córdoba.
- Luque-Almagro VM, Blasco R, Fernández-Romero JM, Castro MDL (2003). Flow-injection spectrophotometric determination of cyanate in bioremediation processes by use of immobilised inducible cyanase. *Anal Biol Chem*, 377:1071-1078.
- Luque-Almagro VM, Blasco R, Huertas MJ, Martínez-Luque M, Moreno-Vivián C, Castillo F, Roldán MD (2005a). Alkaline cyanide biodegradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Biochem Soc Trans*, 33:168-9.
- Luque-Almagro V.M, Huertas MJ, Martínez-Luque M, Moreno-Vivián C, Roldán MD, García-Gil J, Castillo F, Blasco R (2005b). Bacterial degradation of cyanide and its metal complexes under alkaline conditions. *Appl Environ Microbiol* 71:940-947.

- Luque-Almagro VM, Huertas MJ, Roldán MD, Moreno-Vivián C, Martínez-Luque M, Blasco R, Castillo F (2007). The cyanotrophic bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 responds to cyanide by defence mechanisms against iron deprivation, oxidative damage and nitrogen stress. *Environ Microbiol*, 9:1541-1549.
- Luque-Almagro VM, Huertas MJ, Sáez LP, Luque-Romero MM, Moreno-Vivián C, Castillo F, Roldán MD, Blasco R (2008) Characterization of the *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 cyanase, an enzyme that is not essential for cyanide assimilation. *Appl Environ Microbiol*, 74:6280-6288.
- Luque-Almagro VM, Blasco R, Martínez-Luque M, Moreno-Vivián C, Castillo F, Roldán MD, (2011a). Bacterial cyanide degradation is under review: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, a case of an alkaliphilic cyanotroph. *Biochem Soc Trans*, 39:269-274.
- Luque-Almagro VM, Merchán F, Blasco R, Igeño MI, Martínez-Luque M, Moreno-Vivián C, Castillo F, Roldán MD, (2011b). Cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 involves a malate:quinone oxidoreductase and an associated cyanide-insensitive electron transfer chain. *Microbiology*, 157:739-746.
- Luque-Almagro VM, Acera F, Igeño MI, Wibberg D, Roldán MD, Sáez LP, Hennig M, Quesada A, Huertas MJ, Blom J, Merchán F, Escribano MP, Jaenicke S, Estepa J, Guijo MI, Martínez-Luque M, Macías D, Szczepanowski R, Becerra G, Ramirez S, Carmona MI, Gutiérrez O, Manso I, Pühler A, Castillo F, Moreno-Vivián C, Schlüter A, Blasco R (2013). Draft whole genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Environ Microbiol*, 15:253-270.
- Luque-Almagro VM, Escribano MP, Manso I, Sáez LP, Cabello P, Moreno-Vivián C, Roldán MD (2015). DNA microarray analysis of the cyanotroph *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in response to nitrogen starvation, cyanide and a jewelry wastewater. *J Biotechnol*, 214:171-81.
- Luque-Almagro VM, Moreno-Vivián C, Roldán MD (2016). Biodegradation of cyanide wastes from mining and jewellery industries. *Curr Opin Biotech*, 38:9-13.

- Makui H, Roig E, Cole ST, Helmann JD, Gros P, Cellier MF (2000). Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol Microbiol*, 35:1065-1078.
- Malki M, González-Toril E, Sanz JL, Gómez F, Rodríguez N, Amils R (2006). Importance of the iron cycle in biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy*, 83:223-228.
- Mandel M, Higa A (1970). Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, 53:154-162.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Manso MI, Ibáñez I, de la Peña F, Sáez LP, Luque-Almagro VM, Castillo F, Roldán MD, Prieto MA, Moreno-Vivián C (2015). *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, a cyanide-degrading bacterium with by-product (polyhydroxyalkanoates) formation capacity. *Microb Cell Fact*, 14:77-88.
- Maradonna F, Nozzi V, Santangeli S, Traversi I, Gallo P, Fattore E, Mita DG, Mandich A, Carnevali O (2015). Xenobiotic-contaminated diets affect hepatic lipid metabolism: implications for liver steatosis in *Sparus aurata* juveniles. *Aquat Toxicol*, 167:257-64.
- Maringanti S, Imlay JA (1999). An intracellular iron chelator pleiotropically suppresses enzymatic and growth defects of superoxide dismutase-deficient *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 181:3792-3802
- Marlovits TC, Haase W, Herrmann C, Aller SG, Unger VM (2002). The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:16243-16248.
- Massé E, Gottesman S (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:4620-4625.
- Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG (2002). Bioquímica. Pearson Educación.
- McAfee BJ, Taylor A (1999). A review of the volatile metabolites of fungi found on wood substrates. *Nat Toxins*, 7:283-303.

- Messner KR, Imlay JA (2002). Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *J Biol Chem*, 277:42563-42571.
- Meyers PR, Gokool P, Rawlings DE, Woods DR (1991). An efficient cyanide-degrading *Bacillus pumilus* strain. *J Gen Microbiol*, 137:1397-1400.
- Migula W (1894). Über ein neues System der Bakterien. *Arb Bakteriol Inst Karlsruhe* 1:235-238.
- Migula W (1900). System der Bakterien. Vol: 2. Gustav Fischer. Jena.
- Mishra S, Jyot J, Kuhad RC, Banwari L (2001). Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67:1675-1681.
- Moir D, Paulus H (1977). Immunological and chemical comparison of the nonidentical subunits of aspartokinase II from *Bacillus subtilis* VB217. *J Biol Chem*, 252:4655-61.
- Mongkolsuk S, Helmann JD (2002). Regulation of inducible peroxide stress responses. *Mol. Microbiol. Rev*, 45:9-15.
- Monias BL (1928). Classification of *Bacterium alcaligenes*, *pyocyaneum* and *fluorescens*. *J Infec Dis*, 43:330-334.
- Morrison GR (1971). Microchemical determination of organic nitrogen with Nessler reagent. *Anal Biochem*, 43:527-532.
- Nahrstedt A (1988). Cyanide compounds in biology: Cyanogenesis and the role of cyanogenic compounds in insects. *Cib Found Symp*, 140.
- Nau CD, Konisky J (1989). Evolutionary relationship between the TonB-dependent outer membrane transport proteins: nucleotide and amino acid sequences of the *Escherichia coli* colicin I receptor gene. *J Bacteriol*, 171:1041-1047.
- Neilands, J (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem*, 270:26723-26726.

- Nies DH (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 27:313-339.
- Nishino SF, Spain JC (1993). Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *App Environ Microbiol*, 59:2520-2525.
- Ollinger J, Song KB, Antelmann H, Hecker M, Helmann JD (2006). Role of the Fur regulon in iron transport in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 188:3664-3673.
- Oudjehani K, Zagury GJ, Deschenes L (2002). Natural attenuation potential of cyanide via microbial activity in mine tailings. *App Microbiol Biotechnol*, 58:409-415.
- Palleroni NJ (2010). The *Pseudomonas* story. *Environ Microbiol*, 12:1377-1383.
- Park S, Ely RL (2008). Candidate stress genes of *Nitrosomonas europaea* for monitoring inhibition of nitrification by heavy metals. *Appl Environ Microbiol*, 74:5475-5482.
- Park S, Ely RL (2009). Whole-genome transcriptional and physiological responses of *Nitrosomonas europaea* to cyanide: identification of cyanide stress response genes. *Biotechnol. Bioengineer*, 102:1645-1653.
- Patil YB, Paknikar KM (2000). Biodegradation of silver-cyanide from electroplating industry wastewater. *Lett Appl Microbiol*, 30:33-37.
- Patil YB, Kulkarni AR (2008). Environmental sensitivity and management of toxic chemical waste in mining industry with special reference to cyanide. En: *High Performing Organizations: Needs and Challenges*, Tata McGraw Hill Publications.
- Paul JH (1999). Microbial gene transfer: an ecological perspective. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 1:45-50.
- Pérez-Reinado E (2005). Bases Moleculares de la degradación de polinitrofenoles en *Rhodobacter capsulatus*. *Tesis Doctoral*. Universidad de Córdoba.
- Pickett CL, Hayes L, Earhart CF (1984). Molecular cloning of the *Escherichia coli* K-12 *entACGBE* genes. *FEMS Microbiol Lett*, 24:77-80.

- Podar M, Eads JR, Richradson TH (2005). Evolution of a microbial nitrilase gene family: a comparative and environmental genomic study. *BMC Evol Biol*, 5:42-54.
- Poole LB (1996). Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. Cystine disulfides involved in catalysis of peroxide reduction. *Biochemistry*, 35:65-75.
- Poole LB, Ellis HR (1996). Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 1. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpF and AhpC proteins. *Biochemistry*, 35:56-64.
- Postle K, Good RF (1983). DNA sequence of the *Escherichia coli tonB* gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:5235-5239.
- Quatrini R, Lefimil C, Veloso FA, Pedroso I, Holmes DS, Jedlicki E (2007). Bioinformatic prediction and experimental verification of Fur-regulated genes in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Nucl Ac Res* 35:2153-2166.
- Quesada A, Guijo MI, Merchán F, Blázquez B, Igeño MI, Blasco R (2007). Essential role of cytochrome bd-related oxidase in cyanide resistance of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Appl Environ Microbiol*, 73:5118-5124.
- Quesada-Gómez C (2008). Daño y respuesta al estrés oxidativo en bacterias del género *Bacteroides*: resistencia a los antimicrobianos y mecanismos de virulencia. *Rev Biomed*, 19:162-168.
- Rabus R, Jack DL, Kelly DJ, Saier MH Jr (1999). TRAP transporters: an ancient family of extracytoplasmic solute-receptor-dependent secondary active transporters. *Microbiology*, 145:3431-3445.
- Rai P, Cole TD, Wemmer DE, Linn S (2001). Localization of Fe²⁺ at an RTGR sequence within a DNA duplex explains preferential cleavage by Fe²⁺ and H₂O₂. *J Mol Biol*, 312:1089-1101.
- Ratledge C, Dover L. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 54:881-941.

- Raybuck SA (1992). Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation. *Biodegradation*, 3:3-18.
- Rigali S, Derouaux A, Giannotta F, Dusart J (2002). Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J Biol Chem* 277:12507-12515.
- Rosenberg E, Ron EZ (1996). Bioremediation of petroleum contamination. Principles and Applications. En: *Biotechnology Research*. University Press, Cambridge.
- Roshan R, Gaur A, Balomajumder C (2007). Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. *J Hazard Mat*, 163:1-11.
- Rosner A, Paulus H (1971). Regulation of aspartokinase in *Bacillus subtilis*. The separation and properties of two isofunctional enzymes. *Int J Sys Bacteriol*, 246:2965-2971.
- Sabri M, Leveille S, Dozois CM (2006). A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. *Microbiology*, 152:745-758.
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4:406-425.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning: A laboratory Manual, 2^aed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sarla M, Pandit M, Tyagi DK, Kapoor JC (2004). Oxidation of cyanide in aqueous solution by chemical and photochemical process. *J Hazard Mat*, 116:49-56.
- Sauer M, Hantke K, Braun V (1990). Sequence of the *fhuE* outer-membrane receptor gene of *Escherichia coli* K12 and properties of mutants. *Mol Microbiol*, 4:427-437.
- Schaad NW, Sowell G, Goth RW, Colwell RR, Webb RE (1978). *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. *Int J Sys Bacteriol*, 28:117-125.
- Schafer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski iJ, Thierbach G, Pühler A (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmid

- spK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium*. *Gene*, 145:69-73.
- Shakir FK, Audilet D, Drake III AJ, Shakir KMM. (1994). A rapid protein determination by modification of the Lowry procedure. *Anal Biochem*, 216:232-233.
- Shivaraman N, Parhad N (1991). Biological Treatment of Cyanide Wastewaters. En: *National Environmental Engineering Research Institute*. 39-45.
- Sies H (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr*, 69:965-968.
- Sies H (1993). Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutat Res*, 299:183-191.
- Sies H, Menck CF (1992). Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat Res*, 275:367-375.
- Silberbach M, Hüser A, Kalinowski J, Pühler A, Walter B, Krämer R, Burkovski A (2005). DNA microarray analysis of the nitrogen starvation response of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol*, 119:357-367.
- Siller H, Winter J (1998) Treatment of cyanide-containing wastewater from the food industry in a laboratory-scale fixed-bed methanogenic reactor. *Appl Microbiol Biotech*, 49:215-220.
- Simon R, Priefer U, Pühler A (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology*, 1:784-791.
- Smith A, Mudder T (1991). The chemistry and treatment of cyanidation wastes. *Mining Journal Books Limited*. London.
- Smith KF, Bibb LA, Schmitt MP, Oram DM (2009). Regulation and activity of a zinc uptake regulator, Zur, in *Corynebacterium diphtheria*. *J Bacteriol*, 191:1595-1603.
- Solomonson LP, Vannesland B, Conn EE, Knowles CJ, Westley J, Wissing F (1981). Cyanide as a metabolic inhibitor. En: *Cyanide in Biology*. Academic Press, London.

- Stadtman ER, Levine RL (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25:207-218.
- Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M (1966). The aerobic *Pseudomonads* a taxonomic study. *J Gen Microbiol*, 43:159-271.
- Stojiljkovic I, Bäumlér AJ, Hantke K (1994). Fur regulon in Gram-negative bacteria: identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur titration assay. *J Mol Biol*, 236:531-545.
- Storz G, Jacobson FS, Tartaglia LA, Morgan RW, Siveira LA, Ames BM (1989). An alkylhydroperoxide reductase induced by oxidative stress in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* genetic characterization and cloning of *ahp*. *J Bacteriol*, 171:2049-2055.
- Suh, Y (1994). Biodegradation of cyanide compounds by *Pseudomonas fluorescens* immobilized on zeolite. *Enz Microb Technol*, 16:529-533.
- Taira K, Hirose J, Hayashida S, Furukawa K (1992) Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J Biol Chem*, 267:4844-4853.
- Tang T, Kumar S, Shen Y, Lu J, Wu ML, Shi S, Li WH, Wu CI (2010). Adverse interactions between micro-RNAs and target genes from different species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107:12935-12940.
- Thieme D, Grass G (2010). The Dps protein of *Escherichia coli* is involved in copper homeostasis. *Microbiol Res*, 165:108-115.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Ac Res*, 22:4673-80.
- Timmis KN (2002). *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ Microbiol*, 4:779-781.

- Tiss A, Barre O, Michaud-Soret I, Forest E (2005). Characterization of the DNA-binding site in the ferric uptake regulator protein from *Escherichia coli* by UV crosslinking and mass spectrometry. *FEBS Lett*, 579:5454-5460.
- Topić-Popović N, Strunjak-Perović I, Klobučar RS, Barišić J, Babić S, Jadan M, Kepec S, Kazazić SP, Matijatko V, Beer Ljubić B, Car I, Repec S, Stipaničev D, Klobučar GI, Čož-Rakovac R (2015). Impact of treated wastewater on organismic biosensors at various levels of biological organization. *Sci Total Environ*, 38:23-37.
- Touati D (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys*, 373:1-6.
- Tremaroli V, Vacchi Suzzi C, Fedi S, Ceri H, Zannoni D, Turner RJ (2010). Tolerance of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 to metals, polychlorobiphenyls and chlorobenzoates: effects on chemotaxis-, biofilm- and planktonic-grown cells. *FEMS Microbiol Ecol*, 74: 91-301.
- Ullmann R, Gross R, Simon J, Uden G, Kröger A (2000). Transport of C(4)-dicarboxylates in *Wolinella succinogenes*. *J Bacteriol*, 182:5757-64.
- van Hove B., Staudenmaier H. y Braun V. (1990) Novel two-component transmembrane transcription control: regulation of iron dicitrate transport in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 172:6749-6758.
- Vasil'ev LA, Vorobyov AA, Dzyubinskaya EV, Nesov AV, Shestak AA, Samuilov VD (2007). Cyanide-Induced Death of Cells in Plant Leaves. *Biochemistry*, 72:572-577.
- Vetter J (2000). Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon*, 38:11-36.
- Viñas M, Grifoll M, Sabate J, Solanas AM (2002). Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 28:252-260.
- Wackett LP, Hershberger CD (2001). Biocatalysis and biodegradation. En: *Microbial transformation of organic compounds*. ASM Press, Washington, D.C.
- Walter MV (1997). Bioaugmentation. En: *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington, D.C.

- Wandersman C, Delepelaire P (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol*, 58:611-647.
- Watanabe M, Nishino T, Takio K, Sofuni T, Nohmi T (1998). Purification and characterization of wild-type and mutant classical nitroreductases of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, 273:23922-23928.
- White JM, Jones DD, Huang D, Gauthier J (1998). Conversion of cyanide to formate and ammonia by a pseudomonad obtained from industrial wastewater. *J Ind Microbiol*, 3:263-272.
- Wibberg D, Luque-Almagro VM, Igeño MI, Bremges A, Roldán MD, Merchán F, Sáez LP, Guijo MI, Manso M., Macías D, Cabello P, Becerra G, Ibáñez MI, Carmona MI, Escribano MP, Castillo F, Sczyrba A, Moreno-Vivián C, Blasco R, Pühler A, Schlüter A (2014). Complete genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *J Biotechnol*, 175:67-68.
- Woodmansee AN, Imlay JA (2002). Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron. *J Biol Chem*, 277:34055-34066.
- Wu J, Weiss B (1991). Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 173:2864-2871.
- Wu J, Dunham WR, Weiss B (1995). Overproduction and physical characterization of SoxR, a [2Fe-2S] protein that governs an oxidative response regulon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 270:10323-10327.
- Yreus SC, Robinson AK, Rodríguez-Quiriones F (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev*, 27:215-237.
- Zaharik ML, Cullen VL, Fung AM, Libby SJ, Kujat Choy SL, Coburn B, Kehres DG, Maguire ME, Fang FC, Finlay BB (2004). The *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* divalent cation transport systems MntH and SitABCD are essential for virulence in an Nramp1G169 murine typhoid model. *Infect Immun*, 72:5522-5525.

Zhang JJ y Paulus H (1990). Desensitization of *Bacillus subtilis* aspartokinase I to allosteric inhibition by meso-diaminopimelate allows aspartokinase I to function in amino acid biosynthesis during exponential growth. *J Bacteriol*, 172:4690-4693.

Zheng M, Aslund F, Storz G (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science*, 279:1718-1721.